

**Einsatz der isothermen Wärmeleitungsmikrokalorimetrie  
zur Stabilitätsbeurteilung von Transdermalen Therapeutischen  
Systemen (TTS)**

**DISSERTATION**

**zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt beim  
Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main**

**von  
Silvia Latsch  
aus Potsdam**

**Frankfurt/Main (2003)  
(DF1)**

Vom Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan	Prof. Dr. H. Schwalbe
Gutachter	Prof. Dr. J. Kreuter Prof. Dr. D. Steinhilber
Datum der Disputation	08.12.2003

# Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Kooperation mit der Firma Lohmann Therapie-Systeme LTS angefertigt.

Mein ganz besonderer Dank gilt:

- meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Kreuter für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung sowie freundliche Unterstützung während der Arbeit
- Herrn Dr. Selzer (Baxter GmbH) für die Betreuung sowie für die stete Diskussionsbereitschaft

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei:

- Herrn Dr. Fink und Frau Alig für die Bereitstellung von Messkapazitäten am Röntgendiffraktometer sowie die Unterstützung bei der Durchführung der Messungen und hilfreiche Diskussion der Ergebnisse
- Herrn Dr. Schnabel (LTS) für die Bereitstellung der HPLC-Methode und die Unterstützung bei der Durchführung
- der Firma Lohmann Therapie-Systeme LTS, insbesondere Herrn Dr. Asmussen, für die Finanzierung der Arbeit
- allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Technologie, die am konstruktiven Voranbringen der Arbeit beteiligt waren
- Herrn Taubmann und Herrn Dr. Lemke (C3-Analysentechnik) sowie Herrn Storm für die technische Unterstützung bezüglich des Mikrokalorimeters

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Kristallisation in TTS	1
1.2	Konzepte der Stabilisierung	2
1.2.1	Einfluss der Glasübergangstemperatur	2
1.2.2	Zugabe von Kristallisationsinhibitoren	4
1.3	Stabilitätsbeurteilung	5
<b>2</b>	<b>TTS – TRANSDERMALE THERAPEUTISCHE SYSTEME</b>	<b>8</b>
2.1	Die Hautbarriere	9
2.1.1	Hautpermeationswege	9
2.1.2	Passive Diffusion durch die Haut	10
2.2	Enhancementstrategien	13
2.2.1	Physikalisches Enhancement	14
2.2.1.1	Okklusion	14
2.2.1.2	Übersättigung	14
2.2.1.3	Anwendung von elektrischem Strom	16
2.2.2	Chemisches Enhancement	18
2.2.3	Metabolisches Enhancement	19
2.3	Vor- und Nachteile von TTS	20
2.3.1	Vorteile von TTS gegenüber konventionellen oralen Arzneiformen	20
2.3.2	Nachteile von TTS	20
2.4	Aufbau und Einteilung von TTS	21
2.4.1	TTS mit Membran-permeationskontrollierter Freigabe	22
2.4.2	TTS mit Matrix-diffusionskontrollierter Freigabe	22
2.4.3	Ausblick: Pulsierende Arzneistoffabgabe	24
2.5	Einsatz von TTS	24

<b>3</b>	<b>FESTE LÖSUNGEN UND FESTE DISPERSIONEN</b>	<b>26</b>
3.1	Feste Lösungen	26
3.1.1	Eigenschaften und Einteilung	26
3.1.2	Herstellung von festen Lösungen	27
3.1.2.1	Lösungsmittelverdampfungs-Methode (Solvent evaporation)	27
3.1.2.2	Copräzipitation (Cosolvens-Methode)	27
3.1.2.3	Hot melt-Methode	27
3.2	Feste Dispersionen	28
3.2.1	Eigenschaften und Einteilung	28
3.2.2	Methoden zur Charakterisierung fester Dispersionen	29
3.2.2.1	Polarisationsmikroskopie	29
3.2.2.2	Röntgendiffraktometrie	29
3.2.2.3	IR-Spektroskopie	32
3.2.2.4	Thermoanalytische Methoden	32
<b>4</b>	<b>KALORIMETRIE</b>	<b>35</b>
4.1	Physikalische Grundlagen der Kalorimetrie	36
4.1.1	Wärme	36
4.1.2	Innere Energie	37
4.1.3	Enthalpieänderung	38
4.1.4	Exotherme und endotherme Reaktionen	38
4.2	Klassifikation der Kalorimeter	39
4.2.1	Betriebsart	40
4.2.1.1	Isothermes (wärmeleitendes) Kalorimeter	40
4.2.1.2	Isoperiboles Kalorimeter	43
4.2.1.3	Adiabatisches Kalorimeter	44
4.2.2	Messprinzip	46
4.2.2.1	Messung einer Temperaturdifferenz	46
4.2.2.2	Kompensation des thermischen Effektes	47

---

4.2.3	Bauart	48
<b>5</b>	<b>REAKTIONSKINETIK</b>	<b>50</b>
5.1	Wärmefluss und Kinetik von chemischen Reaktionen	52
5.1.1	Reaktionskinetik 0. Ordnung	54
5.1.2	Reaktionskinetik 1. Ordnung	55
5.1.3	Reaktionskinetik höherer Ordnung	56
5.1.4	Autokatalytische Reaktion	57
5.2	Kinetik von Kristallisationsreaktionen	58
5.2.1	Kristallisationsmechanismus	58
5.2.2	Kristallisationskinetik nach Avrami	62
5.2.3	Kalorimetrische Bestimmung der Kristallisationskinetik	64
<b>6</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>68</b>
6.1	Eigenschaften der Arzneistoffe	68
6.1.1	17 $\beta$ -Estradiolhemihydrat	68
6.1.1.1	Eigenschaften	68
6.1.1.2	Kristallformen	69
6.1.1.3	Pulverröntgenbeugung und Kristallgitter	72
6.1.2	Norethisteronacetat (NEA)	75
6.1.2.1	Eigenschaften	75
6.1.2.2	Pulverröntgenbeugung und Kristallgitter	76
6.2	Herstellung der TTS	78
6.2.1	Auswahl des Matrixpolymers	78
6.2.2	Herstellung der TTS-Laminate	79
6.2.2.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	79
6.2.2.2	Herstellung der Zweischicht-Laminate	80
6.2.2.3	Herstellung von Mehrschicht-TTS mit semipermeabler Membran	80

6.2.3	Übersicht über die verwendeten Rezepturen	81
6.2.3.1	Wirkstoffhaltige Lamine	81
6.2.3.2	Placebo-TTS	82
6.3	Flächengewicht und Gleichförmigkeit der Masse	83
6.3.1	Bestimmung des Flächengewichtes	83
6.3.1.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	83
6.3.1.2	Qualifizierung des Stanzeisens	83
6.3.1.3	Durchführung	83
6.3.2	Prüfung auf Gleichförmigkeit der Masse	83
6.4	Polarisationsmikroskopie	85
6.4.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	85
6.4.2	Technische Daten	85
6.4.3	Durchführung	85
6.5	Mikrokalorimetrie	86
6.5.1	Aufbau des TAM 2277	86
6.5.2	Messprinzip des TAM	89
6.5.3	Basislinienstabilität	89
6.5.3.1	Leere Messkanäle	89
6.5.3.2	Leere Edelstahllampullen	89
6.5.3.3	Signal-Rauschen der Basislinie	90
6.5.4	Kalibrierung	90
6.5.4.1	Interne Kalibrierung	90
6.5.4.2	Externe Kalibrierung	92
6.5.4.3	Durchführung der Kalibrierung	92
6.5.5	Mikrokalorimetrische Messparameter	95
6.5.5.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	95
6.5.5.2	Messparameter	95
6.5.5.3	Durchführung der Messung	96
6.5.6	Auswertung der Wärmeflusskurven	97
6.5.6.1	Arzneistoff-immanenter Wärmefluss	97

---

6.5.6.2	Berechnung von initialem Wärmefluss und Wärmemenge	97
6.6	Differential Scanning Calorimetry (DSC)	98
6.6.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	98
6.6.2	Messparameter	99
6.7	Pulverröntgenbeugung	100
6.7.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	100
6.7.2	Messparameter und Durchführung	100
6.7.2.1	Messparameter am Guinier-Diffraktometer	100
6.7.2.2	Durchführung	100
6.7.3	Probenhalterfolie	101
6.7.4	Normierung der Intensität der Röntgenröhre	102
6.7.5	Amorpher Anteil im TTS und Normierung über das Flächengewicht	103
6.7.6	Eignung der Pulverröntgenbeugung zur Bestimmung der Kristallinität in TTS	105
6.7.7	Auswahl der charakteristischen Reflexe	107
6.7.7.1	Charakteristische Estradiol-Reflexe	107
6.7.7.2	Charakteristische NEA-Reflexe	110
6.8	HPLC-Analytik	113
6.8.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	113
6.8.1.1	Chemikalien	113
6.8.1.2	Verbrauchsmaterialien	113
6.8.1.3	Geräte	113
6.8.2	Methode	114
6.8.2.1	Probenvorbereitung	114
6.8.2.2	Analysenbedingungen bei der Bestimmung mittels HPLC	115
6.8.3	Validierung	116
6.8.3.1	Standard-Lösungen zur Identifizierung der beiden Arzneistoffe	116
6.8.3.2	NEA-Standard	116
6.8.3.3	Estradiol-Standard	117
6.8.3.4	Estron-Standard	119
6.8.3.5	Zersetzungsprodukte und Datenauswertung	121



<b>7</b>	<b>ANALYTIK DER ARZNEISTOFFE</b>	<b>122</b>
7.1	E2-hemihydrat	122
7.2	Norethisteronacetat (NEA)	123
7.3	Wirkstoffkombination von Estradiol und NEA	126
7.3.1	Differential Scanning Calorimetry (DSC)	127
7.3.2	Pulverröntgenbeugung	129
<b>8</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER PLACEBO-SYSTEME</b>	<b>133</b>
8.1	Pulverröntgenbeugung	133
8.1.1	TTS PLA 0	133
8.1.2	TTS PLA 1	134
8.2	Mikrokalorimetrie	135
8.3	DSC-Analytik	136
<b>9</b>	<b>KRISTALLISATION VON ESTRADIOL-HALTIGEN TTS</b>	<b>138</b>
9.1	Polarisationsmikroskopie	138
9.2	Pulverröntgenbeugung	138
9.3	Mikrokalorimetrie	144
9.4	HPLC-Bestimmung der Sättigungslöslichkeit	150
9.5	Kristallisationskinetik	151
<b>10</b>	<b>KRISTALLISATION VON NEA-HALTIGEN TTS</b>	<b>155</b>
10.1	Polarisationsmikroskopie	155
10.2	Pulverröntgenbeugung	157

10.3	Mikrokalorimetrische Messung	160
10.4	HPLC-Bestimmung der Sättigungslöslichkeit	164
10.5	Kristallisationskinetik	165
10.6	Temperaturabhängigkeit der Kristallisation	167
<b>11</b>	<b>TTS MIT HORMONKOMBINATION</b>	<b>169</b>
11.1	Kristallisation in TTS mit 8,7 % NEA und verschiedenen E2-hemihydrat-Konzentrationen	169
11.1.1	Polarisationsmikroskopie	169
11.1.2	Pulverröntgenbeugung	172
11.1.3	Mikrokalorimetrie	176
11.1.4	Einfluss des Ausstanzens auf die Wärmeflusskurve	178
11.1.5	Einfluss des Einfrierens auf die Kristallisation	180
11.1.6	DSC-Analytik	180
11.1.6.1	TTS VER 2	180
11.1.6.2	TTS VER 4	184
11.2	TTS mit einem konstanten Verhältnis zwischen E2-hemihydrat und NEA	185
<b>12</b>	<b>METHODEN ZUR STABILISIERUNG VON TTS</b>	<b>195</b>
12.1	Stabilisierung der TTS durch eine Vorbehandlung bei 80°C	195
12.2	Effekt von Zusatzstoffen auf die Kristallisation	199
<b>13</b>	<b>INSTABILITÄT DURCH ZERSETZUNG</b>	<b>202</b>
13.1	Zersetzung von NEA	202
13.2	Zersetzung von E2-hemihydrat	205

<b>14</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN</b>	<b>208</b>
14.1	Kristallisation der Wirkstoffe	208
14.2	Kristallisationsvorgänge durch Ausstanzen	209
14.3	Kristallisationskinetik	211
14.4	Vergleich der Methoden	211
14.4.1	Mikrokalorimetrie	212
14.4.2	Pulverröntgenbeugung	213
14.4.3	Polarisationsmikroskopie	214
<b>15</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>216</b>
<b>16</b>	<b>VERWENDETE UND ZITIERT LITERATUR</b>	<b>222</b>

# 1 Einleitung

Die Hormonersatztherapie stellt eine häufige Indikation für die Applikation von Transdermalen Therapeutischen Systemen (TTS) dar. TTS bieten die Möglichkeit, eine kontinuierliche und kontrollierte Arzneistoffzufuhr über die Haut zu erreichen. Das Stratum corneum stellt dabei eine starke Barriere für die Arzneistoffpermeation dar, sodass die Anwendung auf wenige hochwirksame Arzneistoffe beschränkt ist.

Einige Methoden wurden untersucht, um die Hautpermeation zu steigern. Chemische Penetrationsenhancer verändern die Barriereigenschaften der Haut, wohingegen physikalisches Enhancement, wie Iontophorese und Sonophorese, komplexe und teure Freigabesysteme benötigt. Die Übersättigung liefert eine attraktive Alternative dazu, denn es wurde gezeigt, dass die Arzneistoffpermeation mit erhöhter Beladungsrate steigt (Davis & Hadgraft 1991, Pellett et al. 1994, Megrab et al. 1995, Hadgraft 1999, Schwarb et al. 1999, Iervolino et al. 2000 & 2001). Dabei müssen die Wirkstoffe in der adhäsiven Matrix gelöst vorliegen, denn kristalline Aggregate können die Haut nicht durchdringen und sind deshalb für den Arzneistofftransport inaktiv (Kotiyani & Vavia 2001, Kim & Choi 2002). Liegen feste Dispersionen vor, so stellt der ungelöste Anteil des Wirkstoffs einen Vorrat dar, aus dem er sich nach Arzneistoffabgabe bis zum Erreichen des Sättigungszustandes lösen kann, um die Sättigungskonzentration über die Applikationszeit aufrecht zu erhalten. Der Arzneistofftransport ist bei Dispersionen unabhängig von der Gesamtarzneistoffkonzentration, weil der Flux aus gesättigten Systemen konstant ist (Davis & Hadgraft 1991, Pellett et al. 1994, Hadgraft 1999, Raghavan et al. 2000).

## 1.1 Kristallisation in TTS

Um eine hohe Hautpermeabilität zu erreichen und eine therapeutisch wirksame Dosis an den Körper freigegeben zu können, wird in den TTS häufig eine Arzneistoffkonzentration nahe an oder sogar über der Sättigungskonzentration der druck-sensitiven Matrix benötigt. Dadurch entstehen thermodynamisch metastabile bzw. instabile Systeme, in denen der Arzneistoff häufig nach der Herstellung noch für einige Zeit in amorphen Agglomeraten im Träger

verteilt ist. Diese metastabilen Agglomerate können durch Diffusion im Polymer entweder unter Ausbildung einer stabilen festen Lösung verschwinden oder sich durch Zudiffusion weiterer Arzneistoffmoleküle vergrößern und eine feste Dispersion bilden (Kreuter 1999). Als Folge der Übersättigung kann der Arzneistoff, der während des Produktionsprozesses und kurzzeitig danach gelöst vorliegt, während der Lagerung teilweise kristallisieren (Stefano et al. 1997, Variankaval et al. 1999, Lipp & Müller-Fahrnow 1999, Kim & Choi 2002), da sich der Wirkstoff in übersättigter amorpher Lösung in einem energetisch höheren Zustand befindet als die kristalline Form (Saleki-Gerhardt et al. 1994, Elamin et al. 1995). Dieses Phänomen der Kristallisation findet man nicht nur in TTS, sondern auch bei der Nachhärtung von Tabletten (Burger et al. 1980). Es handelt sich hierbei um physikalische Instabilitäten, die die Hautpermeation bzw. die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs über die Lagerperiode herabsetzen können (Ford 1986, Davis & Hadgraft 1991, Hülsmann et al. 2001, Kotiyan & Vavia 2001, Kim & Choi 2002). Die Anwendung der Übersättigung als Mittel der Permeationssteigerung ist also in den meisten Fällen durch die physikalische Instabilität der Systeme begrenzt. Deshalb ist die Kontrolle der Arzneistoffkristallisation von besonderem Interesse für die Entwicklung von effizienten TTS.

## **1.2 Konzepte der Stabilisierung**

### **1.2.1 Einfluss der Glasübergangstemperatur**

Die Geschwindigkeit des Übergangs vom amorphen in den kristallinen Zustand ist von der Mobilität der Moleküle im Trägersystem abhängig. In allen amorphen Polymeren bzw. in den amorphen Regionen von kristallinen Polymeren wird ein Glasübergang gefunden. Ein Glasübergang beinhaltet die reversible Transformation vom amorphen glasartigen Zustand zum gummiartigen Zustand innerhalb eines engen Temperaturbereiches (Elamin et al. 1995). Diese beiden amorphen Zustände unterscheiden sich stark in ihrer spezifischen Wärme, dem Volumen, der Viskosität und der molekularen Mobilität (Diffusionskoeffizient).

Glasartige Feststoffe sind spröde, die Molekülbewegung ist reduziert und die Diffusion nimmt ab. Die Viskosität steigt auf mehr als  $10^{12}$  Pa·s (Kerc & Srcic 1995). Eine

Kristallbildung findet unter diesen Bedingungen für gewöhnlich nicht statt, denn unterhalb der Glasübergangstemperatur mangelt es amorphen Arzneistoffen an der entsprechenden Energie für den amorph-kristallinen Übergang. Rekristallisationsvorgänge laufen deshalb meist oberhalb der Glasübergangstemperatur der Formulierung und unterhalb des Schmelzpunktes des Arzneistoffes ab (Saleki-Gerhardt et al. 1994). Je höher also die Glasübergangstemperatur der Formulierung ist, desto höher ist die Stabilität gegenüber Rekristallisation (Hülsmann et al. 2001), aber auch chemische Zersetzungsreaktionen sind in einer glasartigen Matrix verlangsamt.

Die Glasübergangstemperatur von Polymeren kann durch den Zusatz von Weichmachern (Verhoeven et al. 1989, Hamaura & Newton 1999, Hino & Ford 2001, Fujimori et al. 2002) bzw. durch inkorportierte Arzneistoffe (Nair et al. 2001) stark abgesenkt werden, was die Stabilität der Formulierung negativ beeinflusst (Fujimori et al. 2002). Aber auch eine hohe Umgebungsfeuchte und die damit verbundene Inkorporation von Wasserdampf in die amorphen Regionen besitzt weichmacherähnlichen Charakter und kann die Glasübergangstemperatur unter die Lagertemperatur absenken (Verhoeven et al. 1989, Elamin et al. 1995, Mizuno et al. 1998, Buckton & Darcy 1999, Hamaura & Newton 1999, Taylor et al. 2001). Die resultierende Transformation der amorphen Formulierung vom glasartigen in den gummiartigen Zustand begünstigt Kristallisationsprozesse, da die erniedrigte Viskosität mit einer Erhöhung des Diffusionskoeffizienten und einer erleichterten Diffusion der gelösten Arzneistoffmoleküle zu den Kristallkeimen einhergeht.

In TTS ist es jedoch nicht möglich, dass sich die Arzneistoffmatrix im glasartigen und damit gegen die Kristallisation metastabilen Zustand befindet, da glasartige Polymere eine geringere Freigabe (Fujimori et al. 2002) und keine ausreichende Klebefähigkeit besitzen. Aus diesem Grund müssen Matrices mit einer Glasübergangstemperatur unterhalb der Hauttemperatur hergestellt werden, die sich folglich im instabilen Zustand befinden. Die Zeitverzögerung bis zur Kristallisation hängt von der Temperaturdifferenz zwischen Lagertemperatur und Glasübergangstemperatur ab (Elamin et al. 1995).

### 1.2.2 Zugabe von Kristallisationsinhibitoren

Durch die Zugabe von verschiedenen Polymeren kann die Kristallisation von übersättigten Lösungen reduziert werden (Ma et al. 1996, Lipp 1998, Schwarb et al. 1999, Raghavan et al. 2000 & 2001a, Iervolino et al. 2000 & 2001, Kotiyan & Vavia 2001, Kim & Choi 2002). Diese sogenannten Kristallisationsinhibitoren unterdrücken entweder die Kristallkeimbildung oder das Kristallwachstum. Es wird angenommen, dass der Mechanismus der Retardierung auf der Adsorption des Polymers an die wachsenden Kristallflächen des Arzneistoffs über Wasserstoffbrückenbindungen basiert (Megrab et al. 1995, Ma et al. 1996, Pellett et al. 1997, Tantishaiyakul et al. 1999, Hino & Ford 2001, Iervolino et al. 2001, Kotiyan & Vavia 2001, Raghavan et al. 2001a & 2001b). Dabei bildet sich ein Polymernetzwerk an der Kristalloberfläche aus, durch dessen Schicht die Arzneistoffmoleküle diffundieren müssen. Die Adsorptionsseiten für die Einlagerung von weiteren Arzneistoffmolekülen in das Kristallgitter sind durch Polymermoleküle besetzt. Ist die Adsorption der Polymere an alle Seiten gleich, dann kommt es zu einer Kristallisationsinhibition, wobei die Morphologie der Kristallite gleich bleibt. Eine Änderung der Kristallmorphologie setzt voraus, dass die Adsorption an verschiedene Seiten unterschiedlich ist, wobei die Anzahl der funktionellen Gruppen an jeder Kristallfläche für die Adsorption entscheidend ist. Die Morphologie ist durch die langsamste Wachstumsfläche bestimmt. Die Anlagerung von Polymeren an oder der Einbau in das Kristallgitter verändern die Wachstumscharakteristik des Wirkstoffs stark.

Einige Zusatzstoffe wurden entsprechend ihrer Fähigkeit zur Interaktion mit Arzneistoffen nach ihren inhibitorischen Eigenschaften klassifiziert (Lipp 1998). In diesem Zusammenhang soll angemerkt werden, dass andere Zusatzstoffe das Kristallwachstum fördern und so als Kristallisationsinitiatoren wirken können (Ma et al. 1996). Hierzu zählen beispielsweise Polyethylenglycol 900 (PEG 900) oder Glycerol für Norethisteronacetat und PEG 4000 oder 8000 für Estradiol (Megrab et al. 1995). Zu den Kristallisationsinhibitoren dagegen gehören Polymere, wie Methylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose und Polyvinylpyrrolidon (Megrab et al. 1995, Ma et al. 1996, Schwarb et al. 1999, Tantishaiyakul et al. 1999, Raghavan et al. 2000 & 2001a, Hino & Ford 2001, Iervolino et

al. 2001). Eine geschickte Auswahl der Hilfsstoffe kann also zu einer Erhöhung der physikalischen Stabilität beitragen.

### **1.3 Stabilitätsbeurteilung**

Die Entwicklung von TTS sowie die Untersuchung ihrer Stabilität sind sehr zeitaufwendig. Im Rahmen der Entwicklung eines TTS wäre es daher wünschenswert, eine Methode zur Verfügung zu haben, die Kristallisationsvorgänge schnell und zuverlässig erfassen kann. Diese würde die Stabilitätsuntersuchungen erleichtern und so die TTS-Entwicklung beschleunigen.

Bei der isothermen Wärmeleitungsmikrokalorimetrie handelt es sich um eine sehr empfindliche Methode, die die Bestimmung von geringen Wärmemengen ermöglicht (Buckton & Darcy 1999). Alle physikalischen, chemischen und biologischen Prozesse, wie Kristallisationsvorgänge oder Zersetzungsreaktionen, die die Hauptursache der Instabilität von TTS darstellen, sind mit Energieänderungen verbunden. Die Mikrokalorimetrie hat sich in den letzten Jahren zu einer Methode entwickelt, mit deren Hilfe Zersetzungsgeschwindigkeiten von Arzneistoffen sowie die Stabilität von Arzneiformen bestimmt wurden (Angberg & Nyström 1988, Hansen et al. 1989, Angberg et al. 1990 & 1993, Willson et al. 1995a, 1995b & 1996, Duddu & Weller 1996, Selzer et al. 1998 & 1999). Eine Vielzahl von Kristallisationsprozessen wurde bereits mithilfe der Mikrokalorimetrie detektiert (Xijun et al. 1990, Briggner et al. 1994, Sebhatu et al. 1994, Aso et al. 1995, Angberg 1995, Buckton et al. 1995a, Buckton & Darcy 1995b, Pudipeddi et al. 1995, Ahmed et al. 1996 & 1998, Chidavaenzi et al. 1997 & 2001, Lehto & Laine 1997, Darcy & Buckton 1998, Darcy & Wiencek 1998, Gustafsson et al. 1998, Buckton & Darcy 1999, Kawakami et al. 2002). Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zu überprüfen, ob ein Kristallwachstum im TTS ebenfalls mithilfe der Mikrokalorimetrie nachzuweisen und eine Instabilität innerhalb einer kurzen Messzeit voraussagbar ist.





## TEIL A

### **Theoretische Einführung**

## 2 TTS – Transdermale Therapeutische Systeme

Allen konventionellen Darreichungsformen mit Ausnahme der intravenösen Dauertropfinfusion ist gemeinsam, dass die Arzneistoffabgabe weitgehend nach einer Kinetik erster Ordnung erfolgt. Der Arzneistoff wird rasch freigesetzt, gelangt an den Wirkort und erreicht dort eine initial hohe Konzentration. Diese fällt bis zur nächsten Verabreichung exponentiell ab. Hohe und niedrige Blutspiegel wechseln miteinander ab, sodass nur für eine kurze Zeit die optimale therapeutische Konzentration erreicht wird. Will man diese Schwankungen vermeiden, so muss die Applikationsfrequenz erhöht werden (Heilmann 1984).

Nach Zaffaroni ist ein therapeutisches System eine arzneistofftragende Darreichungsform, die einen oder mehrere Arzneistoffe in vorausbestimmter Rate kontinuierlich über einen festgelegten Zeitraum an den Anwendungsort abgibt (Heilmann 1984). Dadurch wird ein Gleichgewicht zwischen der Zufuhr und Elimination des Wirkstoffes hergestellt. Die Folge sind gleichmäßige Plasmaspiegel über den vorgesehenen Applikationszeitraum. Durch den kontinuierlichen Arzneistoffeinstrom wird die effektive Dosis verringert, was mit einer Verringerung von Nebenwirkungen einhergeht (Frigerio & Bodega 1997).

Transdermale Therapeutische Systeme (TTS) sind wirkstoffhaltige Pflaster, die den Arzneistoff über die Haut in das darunterliegende Gewebe und die Blutgefäße abgeben, sodass dieser systemisch wirksam werden kann (Schiller & Schmidt 2002). Während der Applikationszeit wird der Arzneistoff mit annähernd konstanter Geschwindigkeit freigesetzt, was durch eine hohe Arzneistoffbeladung als Energiequelle und ein abgabekontrollierendes Element gewährleistet wird (Schalla 1989). Üblicherweise werden während der Applikationszeit nur circa 10 bis 20 % des Arzneistoffreservoirs freigesetzt.

Den Arzneistofftransport in den Blutkreislauf kann man sich als durch zwei in Serie geschaltete Widerstände vorstellen. Den ersten Widerstand stellt das Abgabekontroll-element des TTS dar, während der zweite durch die Haut als biologische Barriere gebildet wird (Heilmann 1984). Der Hautwiderstand ist variabel, da unterschiedliche Hautareale durch ihre differierende Dicke und den schwankenden Hydratationszustand verschiedene Permeationseigenschaften besitzen. Voraussetzung für gleichbleibende Wirkstoffspiegel ist

daher, dass die Freisetzung des Wirkstoffs aus dem TTS geringer ist als seine Permeationsrate durch das Stratum corneum der Haut und dadurch die Arzneistoffzufuhr unabhängig von den individuellen Gegebenheiten, wie Hauttyp, ausgewählter Hautstelle sowie Alter und Temperatur, wird (Pflegel & Dittgen 1987, Schalla 1989, Reitz 1995, Hadgraft 1999). Unter realen Bedingungen wird jedoch der Arzneistoffeinstrom nicht vollständig vom TTS kontrolliert.

## **2.1 Die Hautbarriere**

Die Aufgabe der Haut besteht unter anderem darin, Schutzbarriere gegen das Eindringen von Mikroorganismen, Viren und toxischen Chemikalien zu sein sowie den Austritt physiologisch lebenswichtiger Stoffe, wie Wasser, aus dem Körper zu verhindern. Deshalb ist die Haut für die meisten Arzneistoffe relativ undurchdringlich (Heilmann 1984). Dabei bildet das Stratum corneum, die Hornschicht, die eigentliche Barriere, denn der Durchtritt von Arzneistoffen in tiefere Hautschichten verläuft hier am langsamsten.

Das Stratum corneum besteht aus abgestorbenen, keratinisierten und partiell dehydratisierten Epidermiszellen (Corneozyten) und ist beim Menschen zwischen 10 und 50 µm dick (Pflegel & Dittgen 1987, Dittgen 1997 & 1998). Hydrophile und lipophile Schichten wechseln miteinander ab. Hydrophile Fraktionen befinden sich in Form von Proteinmatrices vor allem intrazellulär, während die lipophilen Schichten aus Cholesterol, freien und veresterten Fettsäuren sowie Sphingophospholipiden, die für die geringe Permeation von Wirkstoffen verantwortlich sind, eher interzellulär gebildet werden (Potts et al. 1991). Das Stratum corneum wird von Haarfollikeln, Talg- und Schweißdrüsen unterbrochen.

### **2.1.1 Hautpermeationswege**

Die Penetration durch die Haut kann entweder transepidermal oder durch die Poren erfolgen (Abb. 2.1). Beim transepidermalen Transport werden interzellulärer und transzellulärer Weg unterschieden. Die Aufnahme über die Poren erfolgt entweder transglandulär durch die Hautporen der Schweiß- und Talgdrüsen oder transfollikulär durch die Haarschäfte. Die

Anhangsgebilde, wie Schweißdrüsen, Talgdrüsen und Haarfollikel spielen beim Durchtritt durch die Haut jedoch nur eine geringe Rolle, da sie nur 0,1 bis 0,5 % der Hautoberfläche bilden.

Für die Arzneistoffpassage ist also wegen des hohen Flächenanteils vor allem der transepidermale Weg von entscheidender Bedeutung. Welche Route bevorzugt wird, hängt von den chemischen Eigenschaften des betreffenden Wirkstoffs und seinen Verteilungs- und Diffusionskoeffizienten in den verschiedenen Bereichen ab (Ziegenmeyer 1989). Während polare Stoffe zum größten Teil die transzelluläre Barriere durchqueren, wird angenommen, dass bei unpolaren Eigenschaften die interzelluläre Route an Bedeutung gewinnt.

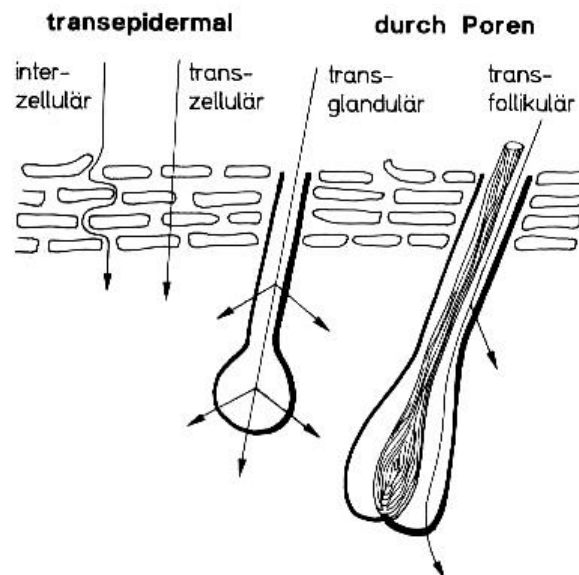


Abb. 2.1. Penetrationswege durch die Haut (aus Bauer et al. 1997).

### 2.1.2 Passive Diffusion durch die Haut

Für die Diffusion durch eine isotrope lipophile Membran gilt das 1. Ficksche Diffusionsgesetz (Gl. 1). Auch für die Hautpermeation kann der Arzneistofftransport hierdurch mit hinreichender Genauigkeit beschrieben werden (Bauer et al. 1997). Dabei wird das Stratum corneum als einfache homogene Membran behandelt, obwohl es sich

eigentlich um eine heterogene, zweiphasige Membran mit lipophilen und hydrophilen Elementen handelt.

$$J = \frac{D \cdot k_{sc} \cdot \Delta C}{h} = P \cdot \Delta C \quad \text{Gl. 1}$$

Der Substanzfluss  $J$  ist direkt proportional zur Diffusionskonstanten  $D$  der gelösten Substanz im Stratum corneum, zum Verteilungskoeffizienten  $k_{sc}$  zwischen Stratum corneum und Vehikel und zum Konzentrationsgefälle  $\Delta C$  beiderseits der Hornschicht. Eine Erhöhung der Hornschichtdicke  $h$  erniedrigt dagegen den Substanzfluss.

Der Konzentrationsgradient des Arzneistoffs zwischen Hautoberfläche und Blutkapillaren  $\Delta C$  stellt die treibende Kraft der Hautpermeation dar. Da infolge des Abtransports des penetrierenden Wirkstoffs durch das Blut die Plasmawirkstoffkonzentration stets sehr niedrig ist, auf der anderen Seite der Hornschicht jedoch ein Arzneistoffüberschuss im TTS vorliegt, ist eine nahezu konstante Diffusion durch die Haut gewährleistet (Reitz 1995, Bauer et al. 1997). Hohe Arzneistoffkonzentrationen in der Matrix führen in der Regel zu hohen Flussraten und damit zu hohen Dosen, die verabreicht werden können. Bei ausreichender Dosierung kann die Applikationsfläche der Pflaster reduziert werden.

Nach Gl. 1 lassen sich aus den Eigenschaften der Arzneistoffe verschiedene Effekte auf die Permeationsrate ableiten (Tab. 2.1). Die Diffusionskonstante  $D$  ist näherungsweise umgekehrt proportional zur Quadratwurzel aus der relativen Molekülmasse der permeierenden Arzneistoffe. Molare Massen bis zu 600 g/mol wirken sich wenig auf die Diffusionskonstante aus, während große Arzneistoffmoleküle zu einem stark verringerten Diffusionskoeffizienten führen (Ziegenmeyer 1989). Der Hydratationszustand der Haut oder Lösungsmittelleffekte verändern dagegen den Verteilungskoeffizienten  $k_{sc}$ . Wird die Affinität des Wirkstoffs zur Hornschichtbarriere verbessert, so fördert dies den Permeabilitätskoeffizient  $P$  (Ziegenmeyer 1989).

Die perkutane Absorption ist auch vom Applikationsort abhängig (Tab. 2.2). Die Permeabilität für Arzneistoffe ist nicht an jeder Hautstelle gleich, da auch die Hautdicke  $h$  an verschiedenen Körperstellen unterschiedlich ist.

	MW	log $k_{\text{oct}}^*$	log $k_{\text{sc}}^{**}$	log (D/h)	log P
Estradiol	272,4	4,01	1,66	-5,18	-3,52
		4,01	1,66	-3,94	-2,28
Testosteron	288,4	3,32	1,36	-4,76	-3,40
Progesteron	314,5	3,05	2,02	-4,84	-2,82
Hydroxyprogesteron	330,5	2,97	1,60	-4,82	-3,22
Hydrocortison	362,5	1,61	0,85	-6,37	-5,52
		1,61	0,85	-4,78	-3,93

\* Verteilungskoeffizient Octanol/Wasser

\*\* Verteilungskoeffizient Stratum corneum/Wasser

Tab. 2.1. Permeabilitätskoeffizienten für verschiedene Steroidhormone (nach Roberts et al. 1996).

Unterarm	1
Fußsohle (Gewölbe)	0,14
Handfläche	0,83
Rücken	1,7
Kopfhaut (behaart)	3,5
Achselhöhle	3,6
Stirn	6
Hinterohrregion	13
Skrotum (Testis)	42

Tab. 2.2. Abhängigkeit der perkutanen Absorption des Hydrocortisons vom Applikationsort beim Menschen. Dabei wurde die Wirkstoffpermeation am Unterarm gleich 1 gesetzt (nach Pflegel & Dittgen 1987, Reitz 1995).

## 2.2 Enhancementstrategien

Durch die natürlichen Barriereigenschaften des Stratum corneum und die geringe Durchlässigkeit für topisch applizierte Arzneistoffe ist die Anzahl der verwendbaren Substanzen gering. Für eine erfolgreiche transdermale Applikation werden deshalb verschiedene physikalisch-chemische Anforderungen an die Arzneistoffe gestellt (Högger 1998, Finnin & Morgan 1999, Rall 2000):

- Molekulargewicht  $\leq 1000$  g/mol, besser noch unter 500 g/mol,
- hohe Lipophililität mit einem log P im Bereich 1 bis 3,
- Verteilungskoeffizient  $k_{SC}$  zwischen 1 und 100,
- maximale biologische Halbwertszeit von 6 bis 8 Stunden,
- Schmelzpunkt unter 200°C,
- starke Wirksamkeit und möglichst geringe Tagesdosis (weniger als 1 mg/Tag).

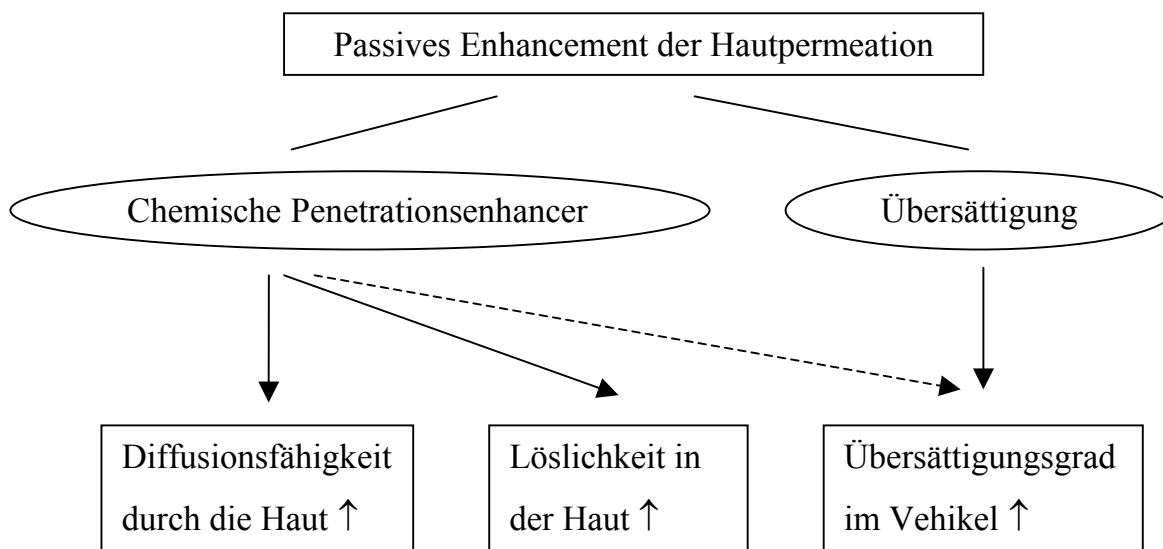


Abb. 2.2. Enhancementstrategien für die Hautpermeation entsprechend dem Fickschen Diffusionsgesetz (nach Moser et al. 2001).

Der Parameter Verteilungskoeffizient kann durch den Einsatz von Prodrugs verändert werden, wobei man Wirkstoffe meist in lipophilere Esterderivate überführt, um die



Bedingungen für eine Hautpassage zu verbessern. Nach der Durchquerung des Stratum corneum werden diese Prodrugs in der Haut durch Esterasen zum aktiven Metaboliten umgewandelt (Schalla 1989, Pflegel & Dittgen 1987).

Um die Bioverfügbarkeit der applizierten Arzneistoffe zu erhöhen, wurden verschiedene Enhancementstrategien entwickelt (Abb. 2.2).

## **2.2.1 Physikalisches Enhancement**

### **2.2.1.1 Okklusion**

Mit wachsender Hydratation der Haut steigt im Allgemeinen die Permeation. Eine Erhöhung des Feuchtigkeitsgehaltes des Stratum corneum erfolgt durch die Okklusivwirkung des TTS selbst, wobei der Wassergehalt von gewöhnlich 10-20 % auf 75-80 % steigt (Asmussen 1991). Die Quellung findet primär in der intrazellulären Proteinmatrix statt. Durch den Kontakt mit den lipophilen Komponenten des Interzellularraumes können sich aber auch wasserhaltige Doppelschichten in diesen Bereichen ausbilden oder es kommt zur Assoziation von Wassermolekülen über Wasserstoffbrücken mit den polaren Kopfgruppen der Lipide, was die Packungsdichte der Lipidketten herabsetzt. Der Diffusionswiderstand wird folglich sowohl im intra- als auch im interzellularen Bereich reduziert.

Folge der Okklusivwirkung des TTS ist ebenfalls eine Temperaturerhöhung der Haut, die permeationsfördernd wirkt. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Permeabilität und dem reziproken Wert der Temperatur (Pflegel & Dittgen 1987).

### **2.2.1.2 Übersättigung**

Als Übersättigung wird ein Zustand bezeichnet, bei dem die Menge an gelöstem Arzneistoff in der Matrix die Sättigungslöslichkeit übersteigt. Die Übersättigung von polymeren Pflastermatrices stellt eine einfache Methode dar, um die Hautpermeation ohne Veränderung der Barriereigenschaften des Stratum corneum zu steigern, denn der Konzentrationsgradient zwischen Pflaster und Blut ist entsprechend dem Fickschen Diffusionsgesetz (Gl. 1) die treibende Kraft für die Permeation. Die Permeation hängt linear

vom Grad der Sättigung ab (Davis & Hadgraft 1991, Pellett et al. 1994 & 1997, Megrab et al. 1995, Hadgraft 1999, Schwarb et al. 1999, Raghavan et al. 2000, Iervolino et al. 2000 & 2001). Eine andere Triebkraft für die Arzneistoffpermeation stellt die Affinität des Arzneistoffs zur polymeren Matrix dar und damit die Tendenz, das Pflaster zu verlassen.

Eine Übersättigung der Systeme kann durch verschiedene Methoden bei der Herstellung oder während der Applikation erreicht werden (Moser et al. 2001):

- Verwendung eines gemischten Cosolvens-Systems,
- Erwärmen und nachfolgendes Abkühlen,
- schnelle Verdampfung des Lösungsmittels (evaporation) bei der Herstellung,
- Wasseraufnahme aus der Haut bei schwer wasserlöslichen Arzneistoffen,
- Verdunstung von flüchtigen Bestandteilen während der Applikation.

Übersättigte Systeme sind metastabil oder instabil und neigen während der Lagerung zur Kristallisation (Stefano et al. 1997, Variankaval et al. 1999, Lipp et al. 1999, Kim & Choi 2002), durch welche die transdermale Arzneistoffaufnahme negativ verändert werden kann. In einigen Fällen bilden sich die Kristalle spontan, in anderen Fällen bleibt der Arzneistoff über lange Zeit in Lösung. Von metastabilen Systemen spricht man, wenn sich ein thermodynamisch instabiles System extrem langsam in die stabile Form umwandelt. Wirken aber externe Einflussfaktoren, wie Luftfeuchtigkeit, Ultraschall oder Fremdkörper (Rührer, Partikel, Kräfte), auf die metastabilen Systeme ein, so kann Kristallkeimbildung stattfinden. Die Grenze zwischen metastabiler und instabiler Zone wird als kritischer Grad der Übersättigung bezeichnet (Pellett et al. 1997).

Da die Arzneistoffpermeation durch die Haut nur von der gelösten Wirkstoffmenge abhängt und die kristalline Phase nicht durch die Haut permeieren kann, ist die Freigabe vom kristallisierten Anteil abhängig (Raghavan et al. 2000 & 2001b, Iervolino et al. 2001, Kotiyan & Vavia 2001, Kim & Choi 2002). Die Freigabe sinkt also mit steigendem Kristallisationsgrad und gesättigte Systeme besitzen unabhängig von der Sättigungskonzentration die gleiche Freigabe (Davis & Hadgraft 1991, Pellett et al. 1997, Hadgraft 1999, Raghavan et al. 2000, Moser et al. 2001). Die praktische Anwendung der Übersättigung als Enhancement-Methode ist durch deren Instabilität begrenzt. Die

Formulierung kann aber durch den Zusatz von verschiedenen Polymeren oder anderen Hilfsstoffen, die die Kristallkeimbildung oder das Kristallwachstum hemmen, stabilisiert werden (Megrab et al. 1995, Pellett et al. 1997, Finnin & Morgan 1999, Iervolino et al. 2000 & 2001, Raghavan et al. 2001a & 2001b).

### **2.2.1.3 Anwendung von elektrischem Strom**

#### **2.2.1.3.1 Iontophorese**

Die Iontophorese bietet die Möglichkeit, die Arzneistoffresorption durch die Haut zu steigern (Schalla 1989). Sie ist als elektrisch unterstützte Bewegung von Ionen über eine Membran unter Anlegen einer geringen externen Potentialdifferenz von  $\ll 100$  V definiert. Die niedrige Spannung wird durch ein elektronisches Gerät kontrolliert und induziert einen konstanten elektrischen Stromfluss über die Haut. Für den Arzneistoffflux werden die bereits existierenden wässrigen Transportwege in der Haut genutzt (Edwards et al. 1995).

Diese Methode lässt sich sowohl für ionisierte als auch für undissoziierte Moleküle einsetzen. Für Ionen besteht der Hauptmechanismus in der Abstoßung zwischen der Elektrode und den gleichartig geladenen Ionen, wobei andere Ionen als der Arzneistoff die Effizienz des Arzneistofftransportes erniedrigen. Bei ungeladenen Molekülen spielen vermutlich elektroosmotische Phänomene und die Bildung kurzlebiger Aufnahmewege eine Rolle (Frigerio & Bodega 1997). Die Iontophorese ist reversibel, allerdings zeigt die iontophoretisch vorbehandelte Haut eine erhöhte passive Permeabilität. Ein Nachteil der Anwendung des elektrischen Stromes ist die damit verbundene Reizung der Nerven in der Haut. Ein Strom von bis zu  $0,5 \text{ mA/cm}^2$  wird als tolerierbar für den Patienten eingestuft (Fang et al. 1999, Singh et al. 1999).

Eine Vorbehandlung mit chemischen Penetrationsenhancern führt zu einer weiteren Erhöhung der Permeabilität. Enhancer können mit der Iontophorese kombiniert werden, um den gleichen Effekt bei geringerer elektrischer Stromstärke zu erreichen und Hautirritationen zu verringern (Fang et al. 1999).

### 2.2.1.3.2 Elektroporation

Die Anwendung kurzer Hochspannungsimpulse eines elektrischen Feldes wird als Elektroporation bezeichnet. Die typische Applikationsdauer eines Pulses beträgt 10  $\mu$ s bis 10 ms.

Durch Elektroporation werden reversibel wässrige Transportwege (Poren) in den Lipiddoppelschichten der Haut erzeugt, durch welche die Arzneistoffe im gleichen Moment angetrieben durch Elektrophorese<sup>1</sup> in erheblich stärkerem Ausmaß als ohne elektrisches Feld diffundieren können (Dittgen 1997). Dieses Phänomen geschieht, wenn die Spannung über einem Bilayer etwa 0,5 bis 1 V erreicht. Es wird angenommen, dass das Stratum corneum aus ungefähr 100 Lipidbilayern besteht, sodass die Elektroporation bei transdermalen Spannungen von  $\geq 100$  V stattfindet (Edwards et al. 1995). Der Transport ist abhängig von der Impulsrate, der Zeit und der angelegten Spannung. Besonders Makromoleküle können vorübergehend gut transportiert werden (Prausnitz 1996).

Eine Kombination von Elektroporation und Iontophorese resultiert in einer höheren transdermalen Permeation als bei der Anwendung einer einzelnen Technik. Ein einziger Hochspannungsimpuls kann die Hautpermeabilität während der anschließenden Iontophorese stark erhöhen. Die Elektroporation verkürzt außerdem die zeitliche Verzögerung der iontophoretischen Freigabe (Chang et al. 2000).

### 2.2.1.3.3 Sonophorese (Ultraschall)

Ultraschall mit Frequenzen zwischen 20 kHz und 3,6 MHz und einer Leistung zwischen 0,15 und 4 W/cm<sup>2</sup> können den Arzneistoffdurchtritt durch die Haut bis auf das 20-fache steigern (Dittgen 1997 & 1998). Niedrigere Frequenzen wurden dabei für die Anwendung bei Proteinen und hydrophilen Arzneistoffen als besonders effektiv beschrieben (Monti et al. 2001).

---

<sup>1</sup> Elektrophorese ist nach Tiselius als Wanderung elektrisch geladener Teilchen in flüssigen Medien im möglichst homogenen elektrischen Feld definiert (1930). Die Wanderungsgeschwindigkeit  $v$  ist dabei proportional der Feldstärke  $E$  sowie der Ionenladung  $Q$  und umgekehrt proportional dem Teilchenradius  $r$  sowie der Viskosität  $\eta$  des Mediums:  $v = QE / 6\pi r\eta$ .

Der Wirkungsmechanismus der Sonophorese ist noch nicht restlos aufgeklärt. Neben einer Erwärmung, die infolge der Temperaturabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten bereits permeationsfördernd wirkt, wird eine Interaktion der Schallwellen mit den Lipiddoppelschichten für die Steigerung des Arzneistoffdurchtritts durch die Haut postuliert. Monti et al. (2001) beobachteten eine stärkere Enhancementaktivität des Ultraschalls auf hydrophile Moleküle, was zu der Annahme führte, dass der transfollikuläre Weg empfindlicher gegenüber Ultraschall ist als der transzelluläre.

### **2.2.2 Chemisches Enhancement**

Permeationspromotoren, auch Enhancer genannt, sind Substanzen, die gleichzeitig mit dem Arzneistoff appliziert werden und dessen Permeation verstärken (Dittgen 1997). Durch Enhancer kann die Gruppe der Arzneistoffe, die für eine Anwendung in TTS geeignet sind, erweitert werden.

Enhancer setzen den Hautwiderstand des Stratum corneum über Löslichkeitseffekte oder eine Veränderung der Diffusionskoeffizienten herab, ohne die lebenden Zellen zu schädigen. Sie sollen dabei eine gute Hautverträglichkeit aufweisen und nicht toxisch oder hautirritierend wirken. Nach Beseitigung des Enhancers sollte die Haut die normalen Barrierefunktionen wiedererlangen.

Die Wirkung der Enhancer ist vor allem auf eine Interaktion mit den Lipidstrukturen zurückzuführen, wobei es zu einer Reduktion der intermolekularen Bindungskräfte und einer stärkeren Unordnung kommt (Asmussen 1991, Potts et al. 1991, Sanctus & Baker 1993). Die Interaktion mit den Lipiden der Lipiddoppelschichten besteht dabei entweder in der Einlagerung der Enhancer zwischen die lipophilen Kohlenwasserstoffketten (Ölsäure, Isopropylpalmitat, Isopropylmyristat, Natriumlaurylsulfat bzw. Azone<sup>®</sup>) oder in der Hydratation der polaren Kopfgruppen der Lipide (Propylenglykol und Harnstoff). Die Phasenübergangstemperatur der Lipidlayer sinkt und die Lipidstrukturen werden verflüssigt (Hadgraft et al. 1996). Aber auch polare Strukturen, wie die intrazellulären Proteine, können einen Angriffspunkt von Enhancern darstellen. Die Trennung von Wasserstoffbrückenbindungen durch Dimethylsulfoxid (DMS) oder Dimethylformamid (DMF) führt zur Auflockerung der Zellen im Stratum corneum.

Durch feuchtigkeitsbindende Substanzen, wie Pyrrolidon, Propylenglycol, n-Dodecanol oder Harnstoff, kann eine Erhöhung des Feuchtigkeitsgehaltes des Stratum corneum und eine damit einhergehende Erhöhung der Wirkstoffpermeation erfolgen. Nichtionische Tenside oder einwertige, kurzkettige Alkohole, wie Ethanol oder Isopropanol, können den Oberflächenlipidfilm der Haut durch Extraktion von Lipiden des Stratum corneum entfernen.

Die Kombination von verschiedenen Enhancern kann einen synergistischen Effekt auf die Wirkstoffpermeation besitzen, der höher ist als die additive Wirkung der einzelnen Enhancer. Die Kombination von Ölsäure und Propylenglycol (Larrucea et al. 2001) sowie von kurzkettigen Alkoholen mit Isopropylmyristat hat sich als besonders effektiv für verschiedene Arzneistoffe erwiesen (Gorukanti et al. 1999).

### **2.2.3 Metabolisches Enhancement**

Die Hautpermeabilität kann ebenfalls durch Stoffe verändert werden, die zu Veränderungen der Hautzusammensetzung führen. Für die Barrierefunktion des Stratum corneum werden drei verschiedene Lipidklassen verantwortlich gemacht, Cholesterol, freie Fettsäuren und Ceramide. Die Barriereigenschaften können folglich durch die Blockade von Enzymen, die für die Synthese der Lipide verantwortlich sind, oder durch Förderung des Metabolismus von Hautlipiden verändert werden (Finnin & Morgan 1999). Die selektive Inhibition der Cholesterol-, Fettsäure- oder Ceramidsynthese verzögert die Wiederherstellung der Hautbarriere und fördert dadurch die transdermale Freigabe. Anwendung finden 5-(Tetradecyloxy)-2-furancarboxylsäure als Fettsäureinhibitor durch die Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase sowie Fluvastatin und Cholesterolsulfat als Cholesterolsyntheseinhibitoren (Tsai et al. 1996).  $\beta$ -Chloroalanin gilt als Inhibitor für die Ceramidsynthese. Eine weitere Fluxerhöhung kann durch vorhergehende Entfernung von Hautlipiden durch Lösungsmittel erreicht werden.

## **2.3 Vor- und Nachteile von TTS**

### **2.3.1 Vorteile von TTS gegenüber konventionellen oralen Arzneiformen**

Die kontinuierliche Arzneistoffzufuhr ist mit konstanten Plasmaspiegeln verbunden. Eine Über- bzw. Unterdosierung kann vermieden und die zu applizierende Arzneistoffmenge reduziert werden, was die Häufigkeit von Nebenwirkungen verringert.

Durch die Umgehung des Magen-Darm-Traktes wird der First-pass-Metabolismus herabgesetzt, was sich ebenfalls positiv auf das Nebenwirkungsprofil auswirkt (Ziegenmeyer 1989, Schmidt 1994). Probleme der gastrointestinalen Umgebung, wie chemische Degradation oder Irritationen, können vermieden werden (Finnin & Morgan 1999). Des Weiteren unterliegt der transdermal resorbierte Arzneistoff kaum Milieuwechseln, wie es im Gastrointestinaltrakt nahrungsbedingt vorkommt, denn die Nahrungsaufnahme verschiebt den pH-Bereich und kann dadurch die Arzneistoffresorption verändern.

TTS finden bevorzugt Anwendung bei stark wirksamen Arzneistoffen mit geringer therapeutischer Breite, wie z.B. Scopolamin, oder kurzer biologischer Halbwertszeit, wie Glyceroltrinitrat oder Nicotin (Högger 1998). Eine kurze biologische Halbwertszeit ist für den Patienten bei konventionellen Arzneiformen mit einer Steigerung der Anwendungsfrequenz und damit mit einer reduzierten Compliance verbunden. Bei kurzen biologischen Halbwertszeiten ist das Zeitmuster der Plasmakonzentration eng an die Arzneistofffreisetzung gebunden. Wird die Arzneistoffabgabe durch Entfernen des TTS unterbrochen, so fällt die Plasmakonzentration rasch von dem therapeutisch wirksamen Niveau auf ein therapeutisch unwirksames ab (Heilmann 1984). Das Resorptionsgeschehen ist demnach gut steuerbar.

### **2.3.2 Nachteile von TTS**

Im Gegensatz zur raschen Unterbrechung der Wirkstoffzufuhr tritt die Wirkung meist erst verzögert ein, da die Diffusionsbarriere der Haut überwunden werden muss. Durch die natürlichen Barriereigenschaften des Stratum corneum und die geringe Bioverfügbarkeit der topisch applizierten Arzneistoffe ist die Anzahl der verwendbaren Arzneistoffe gering.

Bei der Applikation der okklusiv wirkenden Pflaster steigen die Temperatur und der pH-Wert an der Hautoberfläche. Dieses Geschehen führt zu einer histologisch nachweisbaren Entzündung, zu deren Folgen ebenfalls eine erleichterte Besiedlung mit pathogenen Bakterien zählen kann.

Die in TTS verwendeten Hilfsstoffe, insbesondere Ethanol, Hydroxypropylcellulose, Kolophonium sowie polymere Klebstoffe, können irritierende Eigenschaften auf die Haut besitzen und zur Sensibilisierung führen (Koch 2001), was allergische Reaktionen hervorrufen kann. Durch den Einsatz moderner Pflasterklebstoffe auf der Basis von Polyacrylaten und den Verzicht auf Ethanol als Lösungsmittel konnte die Verträglichkeit jedoch stark gesteigert werden (Daniels 1997).

## **2.4 Aufbau und Einteilung von TTS**

Ein Transdermales Therapeutisches System ist definiert über eine definierte Arzneistoffzufuhr zur Haut, eine definierte Arzneistoffbeladung und eine definierte Kontaktfläche für die Arzneistoffpermeation (Dittgen 1997).

TTS bestehen grundsätzlich aus folgenden Bestandteilen (Asmussen 1991):

- einer äußeren Abdeckfolie (backing layer), die eine wasserdampf- und arzneistoffundurchlässige Folie darstellt, Okklusionsbedingungen herstellt und die Diffusionsrichtung des Arzneistoffes bestimmt. Sie dient als Schutzschicht gegen äußere Beanspruchung und schützt die Kleidung gegen Verschmutzung durch Klebstoffe. Die Dicke ist entscheidend für den Tragekomfort.
- einem Arzneistoffreservoir, das eine Polymerzubereitung mit inkorporiertem Arzneistoff darstellt. Dabei kann der Arzneistoff gelöst oder dispergiert im Polymer vorliegen.
- einem polymeren Abgabekontrollelement, wie z.B. einer semipermeablen Steuermembran.
- einer druckempfindlichen Haftschrift, durch die das System eng mit der Haut verbunden wird.
- einer Abziehfolie (protective release liner), die das System bei der Lagerung schützt und vor der Applikation abgezogen wird.



In den meisten Fällen werden mehrere Funktionen von ein- und demselben Element übernommen. So können mit einem geeigneten Polymer die Funktionen von Reservoir, Abgabekontrollelement und Haftschrift kombiniert werden (Dittgen 1997 & 1998).

#### **2.4.1 TTS mit Membran-permeationskontrollierter Freigabe**

Membransysteme besitzen ein flüssiges oder halbfestes Arzneistoffreservoir und eine polymere Steuermembran, die z.B. aus Poly(ethylenvinylacetat)-Copolymer, Polyethylen oder Polypropylen bestehen kann. Die Außenschicht der Membran trägt eine dünne Klebstoffschicht, welche die Verbindung zwischen Haut und Membranfläche bildet. Die Steuermembran kann aber auch aus einer Klebstoffmembran bestehen, die auf eine Polymermatrix aufgebracht wird und deren Permeabilität die Arzneistofffreisetzung bestimmt. Membransysteme können eine Freigabekinetik 0. Ordnung besitzen. Eine Beschädigung des Kontrollelementes führt zur Spontanfreisetzung des Wirkstoffs, dem sogenannten dose dumping (Dittgen 1998).

Das Membransystem nimmt wegen der hohen Produktionskosten einen immer geringeren Anteil an den zugelassenen Fertigarzneimitteln ein.

#### **2.4.2 TTS mit Matrix-diffusionskontrollierter Freigabe**

Matrixsysteme sind im Vergleich zu den Membransystemen einfacher aufgebaut und deshalb preisgünstiger in der Herstellung. Bei ihnen ist der Arzneistoff in hydrophilen oder lipophilen Klebstoffpolymeren gelöst oder in Form von Partikeln homogen dispergiert. Dabei bildet die Matrix zugleich Wirkstoffreservoir, Adhäsivschicht und Abgabekontrollelement. Als Matrixpolymere fungieren z.B. Acrylate oder Siliconklebstoffe, aber auch Polyisobutylen. Die Matrixsysteme gelten als fortschrittliche und sichere Systeme, da kein dose dumping auftreten kann.

Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Freisetzung des Wirkstoffs stellt der Diffusionsprozess in der polymeren Matrix dar. Die durch matrixkontrollierte Diffusion freigesetzte Arzneistoffmenge kann nach der auf Higuchi zurückgehenden Gleichung Gl. 2 berechnet werden. Dabei ist die pro Flächeneinheit freigegebene Arzneistoffmenge  $Q$  zur

Quadratwurzel aus der Freisetzezeit  $t$  proportional. Der Diffusionskoeffizient  $D_M$ , die Sättigungskonzentration  $C_{Sat}$  sowie die Wirkstoffkonzentration  $C_0$  in der Polymermatrix beeinflussen die Arzneistofffreigabe ebenfalls.

$$Q = \sqrt{t \cdot D_M \cdot C_{Sat} \cdot (2C_0 - C_{Sat})} \quad \text{Gl. 2}$$

Eine Freisetzung 0. Ordnung kann nicht ohne weiteres erzielt werden. Um die Arzneistoffliberation möglichst zeitkonstant zu gestalten und eine Annäherung an diese Kinetik zu erreichen, kann in gelartigen und quellbaren Matrices die Case-II-Diffusion ausgenutzt werden. Dabei wandert die Grenze zwischen gelartig gequollenem und glasartigem Polymer mit konstanter Geschwindigkeit von der Oberfläche her in die Matrix hinein. Die aufgrund der osmotischen Aktivität der Matrix eindiffundierenden Wassermengen und die wegdiffundierenden Arzneistoffmengen sind zeitkonstant (Pflegel & Dittgen 1987, Dittgen 1997 & 1998).

Multilayersysteme enthalten den Wirkstoff von oben nach unten in abnehmender Konzentration, sodass nach Applikation ein konstantes Konzentrationsgefälle als treibende Kraft für eine zeitkonstante Arzneistoffliberation aufgebaut wird (Schiller & Schmidt 2002).

Ein weiteres Prinzip, die Arzneistoffliberation annähernd zeitkonstant zu gestalten, ist die Trägerfixierung. Dabei wird der Wirkstoff an ein Trägermaterial, wie z.B. Lactose, adsorbiert. Dieser Träger stellt ein Reservoir dar, aus dem der Arzneistoff desorbiert werden kann, wenn die Konzentration an gelöstem Arzneistoff in der Matrix abnimmt (Pflegel & Dittgen 1987, Dittgen 1997 & 1998).

Die Herstellung von Matrix-TTS erfolgt meist durch Lösen des Polymers sowie des Arzneistoffes in einem organischen Lösungsmittel und anschließendes homogenes Durchmischen. Die Masse wird mithilfe eines Rakels oder eines Streichkastens auf die Abziehfolie oder Trägerfolie ausgestrichen und das organische Lösungsmittel durch Trocknen bei erhöhten Temperaturen verdampft (solvent evaporation). Es ist aber auch möglich, den Arzneistoff bei hohen Temperaturen in das erweichte Polymer einzuarbeiten (hot melt technique) oder die Arzneistoffpartikel mit einem viskosen flüssigen oder halbfesten Polymer bei Raumtemperatur zu mischen und die Polymerketten anschließend mit einem Polymerisator zu vernetzen (Pflegel & Dittgen 1987, Dittgen 1997 & 1998).

### **2.4.3 Ausblick: Pulsierende Arzneistoffabgabe**

Im Gegensatz zu der bisher beschriebenen kontinuierlichen Arzneistoffabgabe könnte ein Ziel für die zukünftige Entwicklung Transdermalen Therapeutischen Systeme die pulsierende Arzneistofffreigabe sein. Das beinhaltet die Entwicklung von TTS, die den Substanzfluss für einige Stunden unterbrechen und anschließend wieder freigeben (Asmussen 1991). Als Anwendung wäre ein pulsierendes Glyceroltrinitrat-TTS zur Angina-pectoris-Prophylaxe denkbar, denn bei der transdermalen Applikation von Glyceroltrinitrat kommt es meist schon nach 24 Stunden zu einer Nitrattoleranz und deutlichen Wirkungsabschwächung. Deshalb wird für Nitroglycerin-haltige TTS nach einer Applikationsdauer von 8 bis 12 Stunden eine nächtliche Nitratpause empfohlen. Weitere mögliche Anwendungsbereiche stellen Wirkstoffe mit natürlichem circadianen Rhythmus dar, wie z.B. Glucocorticoide mit einem Plasmaspiegelmaximum um 8 Uhr morgens.

## **2.5 Einsatz von TTS**

Die Anzahl der TTS hat sich in den letzten Jahren erhöht. Waren 1994 laut Roter Liste nur neun Fertigarzeimittel mit der Darreichungsform TTS auf dem Markt, so sind bis heute deren Anzahl und Indikationen stark gestiegen. In den Bereichen Hormonersatz, Koronarmittel, Entwöhnungsmittel, Analgetika und Antiemetika werden derzeit neun Wirkstoffe in transdermalen Systemen eingesetzt (Nikotin, Glyceroltrinitrat, Estradiol, Norethisteronacetat, Levonorgestrel, Testosteron, Scopolamin, Buprenorphin und Fentanyl) (Rote Liste 2002).

Die weitaus meisten Transdermalen Therapeutischen Systeme auf dem deutschen Markt enthalten Estradiol. Appliziert man das Hormon zur Behandlung der postmenopausalen Beschwerden peroral, so weist es eine geringe Bioverfügbarkeit auf und führt zu unerwünschten Wirkungen, wie Bluthochdruck oder Veränderungen der Leberfunktion. Dies lässt sich vermeiden, wenn Estradiol in Form von TTS verabreicht wird. Es zeigt dann eine sehr gute systemische Verträglichkeit (Daniels 1997).

Zukünftig ist deshalb auch der Einsatz von TTS im Bereich der hormonellen Kontrazeption denkbar. Das System Ortho Evra<sup>TM</sup>/Evra<sup>TM</sup> wurde im Herbst 2001 in den USA zur hormonellen Kontrazeption von der FDA zugelassen (Audet et al. 2001). Dieses gibt pro

Tag 150 µg Norelgestromin und 20 µg Ethinylestradiol an die systemische Zirkulation ab. Die wirkliche Versagerquote der oralen Kontrazeptiva liegt wesentlich höher als ihr Pearl Index bei korrekter Anwendung, was auf eine fehlerhafte Einnahme zurückzuführen ist. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Compliance bei wöchentlicher Pflasteranwendung höher ist als bei der täglichen „Pilleneinnahme“, was in klinischen Studien bestätigt werden konnte. Die Zahl der Probanden mit richtiger Anwendung betrug beim Pflaster 88,2 % und bei der Pille 77,7 %. Ein methodisches Versagen war mit 1 % für beide Methoden etwa gleich häufig, ein Versagen unter Beachtung der Anwendungsfehler war beim Pflaster mit 1,24 % gegenüber 2,18 % bei der Pille tendenziell seltener, wenn auch nicht signifikant.

An weiteren Einsatzgebieten wird intensiv gearbeitet. So wird seit den 80-er Jahren an transdermalen Applikationsformen für Insulin gearbeitet. Eine lipophile Matrix, die Insulin in einer Wasser-in-Öl-Emulsion enthielt, brachte nicht den erhofften Erfolg. Auch die transdermale Freisetzung von monomeren Insulinanaloga durch Iontophorese blieb auf der Stufe von In-vitro- und Tiermodell-Studien stehen (Richter 2000). Inzwischen soll mithilfe von sogenannten Transfersomen das relativ große Peptidmolekül durch die Haut gebracht werden (Brettschneider 2000).

### **3 Feste Lösungen und feste Dispersionen**

Viele moderne Arzneistoffe besitzen nur eine geringe Wasserlöslichkeit und damit auch eine schlechte Bioverfügbarkeit. Feste Lösungen oder Dispersionen können eingesetzt werden, um die Löslichkeit und Bioverfügbarkeit von schwer löslichen Arzneistoffen zu verbessern (Shakhtshneider et al. 1996, Leuner & Dressman 2000). Feste Dispersionen führen zu einem signifikanten Anstieg der Freigaberate im Vergleich zum reinen Arzneistoff oder der physikalischen Mischung (Hülsmann et al. 2000). Die Verbesserung der Freigabe wird dadurch erklärt, dass sich nach Auflösung des Carriers eine feine Suspension aus Arzneistoffpartikeln bildet, deren Partikelgröße geringer und deren Benetzbarkeit besser ist als bei der Auflösung des reinen Arzneistoffs (Leuner & Dressman 2000). Als Einbettungsmaterial oder Carrier für die Arzneistoffe dienen unter anderem hydrophile Polymere. Durch die Verwendung von lipophilen Trägermaterialien kann eine retardierte Freigabe erreicht werden.

#### **3.1 Feste Lösungen**

##### **3.1.1 Eigenschaften und Einteilung**

Feste Lösungen sind vergleichbar mit flüssigen Lösungen. Der Arzneistoff ist ausschließlich molekular-dispers in einem festen „Lösungsmittel“ verteilt und besitzt keine kristallinen Eigenschaften (Kreuter 1999). Feste Lösungen sind also unabhängig von der Anzahl der Komponenten einphasig, was voraussetzt, dass die Bindungsstärke zwischen den verschiedenen Komponenten größer ist als zwischen den Molekülen einer Spezies (Ford 1986).

Auch bei der Herstellung von TTS sind Matrices, die eine feste Lösung darstellen, für die Arzneistoffabgabe von Vorteil. Da der Arzneistoff nicht kristallin vorliegt, ist auch keine Energie nötig, um kristalline Strukturen aufzulösen und den Arzneistoff freizugeben. Bei TTS handelt es sich ausschließlich um amorphe feste Lösungen, denn die Arzneistoffmoleküle sind molekular-dispers in einer polymeren Matrix verteilt. Ein

besonderes Kennzeichen der amorphen festen Lösungen ist, dass die gelösten Stoffe im Polymer diffundieren können (Kreuter 1999). Dies ist bei kristallinen festen Lösungen nur schwer möglich.

### **3.1.2 Herstellung von festen Lösungen**

#### **3.1.2.1 Lösungsmittelverdampfungs-Methode (Solvent evaporation)**

Bei der Solvent evaporation werden Arzneistoff und Carrier in einem gemeinsamen Lösungsmittel gelöst. Die Lösung aus Träger und Arzneistoff stellt ein untersättigtes System dar. Das Lösungsmittel wird anschließend je nach Verwendungszweck entweder durch Trocknung bei erhöhter Temperatur und unter Vakuum, durch Gefriertrocknung oder durch Sprühtrocknung schnell abgedampft (Kreuter 1999). Durch die schnelle Evaporation des Lösungsmittels während der Herstellung wird eine Übersättigung der Systeme erreicht.

#### **3.1.2.2 Copräzipitation (Cosolvens-Methode)**

Auch bei der Copräzipitation werden Arzneistoff und Träger gemeinsam in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und anschließend durch das Zufügen eines Nicht-Lösungsmittels für beide Partner ausgefällt (Kreuter 1999).

#### **3.1.2.3 Hot melt-Methode**

Beim Hot-melt-Verfahren wird eine Mischung aus Wirkstoff und Träger bis zur Schmelze erhitzt, homogenisiert und anschließend schnell abgekühlt (Kreuter 1999). Dies kann z.B. durch Ausgießen auf eine stark gekühlte Oberfläche, Sprühen fein verteilter Tröpfchen in ein gekühltes Luft- oder Flüssigkeitsbad (Sprüherstarrung) oder mittels Extrusion erfolgen. Durch die starke Abkühlung kommt es häufig zu einer Übersättigung (Leuner & Dressman 2000). Ob trotz Übersättigung eine molekulardisperse Verteilung erreicht wird, ist vom Ausmaß der Übersättigung sowie der Abkühlungsgeschwindigkeit abhängig.

Problematisch bei diesem Verfahren können die hohen Schmelzpunkte der eingesetzten Polymere sein, die hohe Temperaturen nötig machen und damit bei Thermolabilität der Arzneistoffe eine Zersetzung fördern (Ford 1986).

## 3.2 Feste Dispersionen

### 3.2.1 Eigenschaften und Einteilung

Feste Dispersionen sind ultrafeine Suspensionen eines festen Arzneistoffes in einem festen Träger. Dabei ist der Arzneistoff im Gegensatz zur festen Lösung nur teilweise molekular verteilt.

Folgende Systeme werden zu den festen Dispersionen gezählt (Tab. 3.1):

- Eutektika, d.h. Mischungen von zwei oder mehreren kristallinen Substanzen, die durch Erstarren einer homogenen Schmelze entstanden sind. Die entstehende physikalische Mischung besteht aus feinen Kristallen der beiden Komponenten, da diese im festen Zustand nur in geringem Maße mischbar sind (Bloch & Speiser 1987).
- kristalline Wirkstoffe in amorphen Trägermaterialien.
- amorphe Präzipitate, d.h. eine amorphe Substanz befindet sich in Aggregaten in einem kristallinen oder amorphen Trägermaterial.

	Wirkstoff	Träger
Vollständig kristalline Suspensionen: Eutektika	kristallin suspendiert	kristallin
Kristalline Wirkstoffe in amorphen Trägern	kristallin suspendiert	amorph
Amorphe Wirkstoffe in kristallinen Trägern	amorph suspendiert	kristallin
Amorphe Wirkstoffe in amorphen Trägern	amorph suspendiert	amorph

Tab. 3.1. Einteilung fester Dispersionen.

### **3.2.2 Methoden zur Charakterisierung fester Dispersionen**

Die Abwesenheit von Kristallen wird als Entscheidungskriterium zwischen fester Lösung und fester Dispersion angesehen. Um Kristallinität nachzuweisen, können verschiedene Methoden angewendet werden.

#### **3.2.2.1 Polarisationsmikroskopie**

Die Wellenzüge des Lichtes schwingen normalerweise in alle Richtungen. Durch geeignete Polarisationsfilter kann eine bestimmte Schwingungsebene herausgefiltert werden, sodass linear polarisiertes Licht entsteht. Das Licht kann dann durch ein zweites Polarisationsfilter total gelöscht werden, wenn man dieses so dreht, dass seine Sperrwirkung senkrecht zu der des ersten steht. Solche um ihre eigene Achse drehbaren Polarisationsfilter können zentriert in den Strahlengang eines Mikroskops eingebaut werden, eines als Polarisator unterhalb des Kondensors und ein zweites als Analysator oberhalb des Objektivs (Müller & Raith 1981, Leeder & Blankenburg 1989).

Der Einsatz eines Polarisationsmikroskops ist dann sinnvoll, wenn Präparate mit Polarisationseigenschaften untersucht werden sollen, die die Ebene von polarisiertem Licht drehen können. Die Sperrwirkung des Analysators wird aufgehoben und das Objekt erscheint hell. Diese Eigenschaft ist nur gegeben, wenn das Präparat regelmäßig zusammengelagerte Einheiten enthält, wie z.B. doppelbrechende Kristalle.

#### **3.2.2.2 Röntgendiffraktometrie**

Röntgenstrahlen besitzen Wellenlängen von 0,2 bis 2,5 Å, die in der Größenordnung von Atom- oder Molekülabständen in einem Kristall liegen. Sie werden deshalb, wie in Abb. 3.1 dargestellt, an Kristallgittern gebeugt (Max von Laue 1912).

Werden Kristalle von einem monochromatischen Röntgenstrahl getroffen, so werden die Röntgenstrahlen an allen parallelen Netzebenen des Kristallgitters mit dem Abstand  $d_{hkl}$  gebeugt (Atkins 1990, Krischner & Koppelhuber-Bitschnau 1994, Allmann 1994, Brittain 2000). Konstruktive Interferenz der gebeugten Strahlung tritt unter der Bedingung auf (Abb.



3.2), dass der Gangunterschied der reflektierten Wellen ein ganzes Vielfaches  $n$  der Wellenlänge  $\lambda$  beträgt und die Bragg-Beziehung Gl. 3 erfüllt ist.

$$n \cdot \lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin \theta \quad \text{Gl. 3}$$

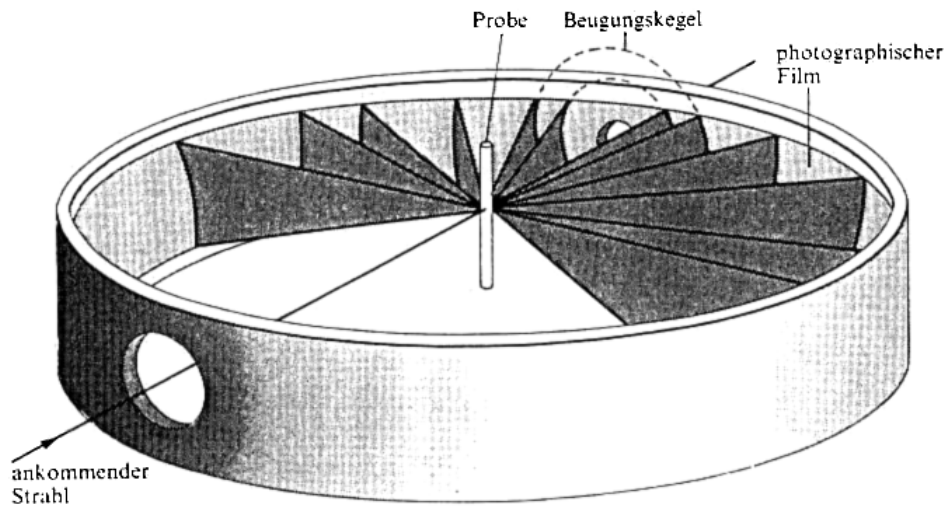


Abb. 3.1. Prinzip der Pulverröntgenbeugung nach dem Debye-Scherrer-Verfahren (aus Atkins 1990).

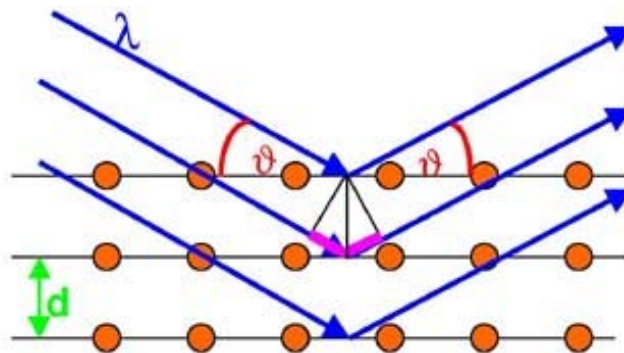


Abb. 3.2. Braggsche Reflexionsbedingung: Die an verschiedenen Netzebenen  $d_{hkl}$  des Kristalls reflektierten Strahlen schwingen nur dann in Phase, wenn der Gangunterschied zwischen eintretendem und reflektiertem Röntgenstrahl ein ganzzahliges Vielfaches der Röntgenwellenlänge  $\lambda$  beträgt.

Kristalle ergeben also charakteristische Reflexmuster der gebeugten Röntgenstrahlen mit dem Beugungswinkel  $\theta$ , die ausschließlich vom Aufbau des Gitters bestimmt werden. Die Reflexe geben ein genaues Bild über die räumliche Lage der Atome im Kristallgitter. Mithilfe von Einkristalldiffraktometern werden deshalb Kristallstrukturanalysen durchgeführt. Ziel ist dabei die Aufklärung von unbekannten Strukturen.

Wesentlich einfacher und universeller anwendbar sind dagegen die röntgenographischen Pulveraufnahmeverfahren. Hier wird das fein gepulverte, kristalline Material mit monochromatischer Röntgenstrahlung untersucht. Durch Pulveraufnahmen lassen sich Aussagen über den Zustand des Materials (kristallin oder amorph), die Art der Kristalle (Substanzdiagnose) und die quantitative Zusammensetzung von Kristallgemischen machen (Pirttimäki et al. 1993). Da die Intensität eines Reflexes von der Häufigkeit des erzeugenden Kristalls im Gemenge proportional abhängt, kann man mithilfe der gemessenen Reflexintensitäten quantitative Analysen durchführen. Ein interner kristalliner Standard konstanter Konzentration in der Probe ist empfehlenswert, um Schwankungen der Probenmenge bzw. der Intensität der Röntgenröhre ausgleichen zu können.

Die Röntgenbeugung dient sowohl zur Charakterisierung von kristallinen als auch von amorphen Trägersystemen (Nair et al. 2001, Kim & Choi 2002). Während Eutektika in der Regel charakteristische Röntgenbeugungsmuster aufweisen, sind amorphe feste Lösungen vor allem durch die Abwesenheit jeglicher Kristallinität, auch des eingebetteten Arzneistoffes, gekennzeichnet. Ein Nachweis von Kristallinität würde gegen die Existenz einer amorphen festen Lösung sprechen. Die Pulverröntgenbeugung stellt eine gute Methode dar, um die Existenz von amorphem Material zu bestimmen, weil es für gewöhnlich einen breiten Buckel zwischen  $2^\circ$  und  $20^\circ$   $2\theta$  aufweist (Byrn et al. 1995) und keine Reflexe im Beugungsdiagramm zeigt.

Durch die Spezifität des Fingerprints der Reflexe bei der Röntgendiffraktometrie kann auftretende Kristallinität selektiv der Kristallstruktur des Arzneistoffs bzw. des Carriers zugeordnet werden. Ihre Anwendung ist deshalb auch bei einem kristallinen Carrier möglich, während die DSC nur bei einem amorphen Träger eingesetzt werden kann. Der Nachteil der Röntgenbeugung besteht jedoch darin, dass Kristallinitäten unter 5 bis 10 % in

einer amorphen Matrix nicht detektiert werden können (Saleki-Gerhardt et al. 1994, Sebhatu et al. 1994, Byrn et al. 1995, Leuner & Dressman 2000).

### **3.2.2.3 IR-Spektroskopie**

Eine Änderung der kristallinen Struktur kann zu Abweichungen in der Bindung zwischen funktionellen Gruppen führen, die mittels IR-Spektroskopie durch die Verschiebung der charakteristischen Signale zu anderen Wellenzahlen detektiert werden können. Allerdings reagieren nicht alle IR-Signale auf die Änderung der kristallinen Struktur.

Die beiden Hydroxylgruppen im Estradiolmolekül können eine Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen vermitteln, die wichtig für die Kristallstrukturstabilität sind. Es kommt zu einer Bindung zwischen alkoholischer und phenolischer Hydroxylgruppe. Diese gebundenen OH-Schwingungen sind von höherer Frequenz als die freien (Variankaval et al. 1999).

Die Anwendung der IR-Spektroskopie bei der Kristallisation in TTS mit hohem Polymeranteil kann zu Problemen führen. Da es nicht möglich ist, die Kristalle auf physikalischem Weg von der Matrix zu trennen, ohne sie zu zerstören, erscheinen breite Matrix-Interferenzen im Spektrum, die geringe Kristallkonzentrationen überdecken können. Die Fingerprintregion des Estradiol-hemihydrats wird vollständig durch die Polymermatrix des TTS überdeckt (Variankaval et al. 1999). So kann es unmöglich sein, zwischen kristallfreier Matrix, die die Arzneistoffe in gelöster Form enthält, und kristallhaltiger Matrix zu unterscheiden (Lipp et al. 1999).

### **3.2.2.4 Thermoanalytische Methoden**

Als thermische Analyse bezeichnet man eine Gruppe von Verfahren, bei denen physikalische und chemische Eigenschaften einer Substanz, eines Substanzgemisches und/oder ihrer Reaktionsprodukte als Funktion der Temperatur gemessen werden, wobei die Probe einem kontrollierten Temperaturprogramm unterworfen ist (Hemminger & Cammenga 1989).

#### 3.2.2.4.1 Differential Scanning Calorimetry

Bei der Differential Scanning Calorimetry (DSC) können Temperaturdifferenzen  $\Delta T_{PR}$  zwischen einer Probe und einer Vergleichsprobe in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen werden (Hemminger & Cammenga 1989). Probe und Referenz werden dabei einem geregelten Temperatur-Zeit-Programm unterworfen. Vom Ofen, dessen Temperatur zeitlinear ansteigt, fließen gleiche Wärmeströme zur Probe und zur Referenz. Wird durch eine Reaktion oder Phasenumwandlung in der Probe Wärme freigesetzt oder verbraucht oder ändert sich ihre Wärmekapazität, so ergibt sich bei konstanter Heizrate eine Temperaturdifferenz  $\Delta T_{RP}$ . Durch die frei werdende Reaktionswärme in der Probe nimmt die Proben temperatur stärker zu als die Vergleichsprobentemperatur, die nach wie vor gleichmäßig ansteigt. Beim Schmelzen wird die Proben temperatur bei Erreichen der Schmelztemperatur so lange konstant bleiben, bis die gesamte Probe geschmolzen ist. Die Temperaturdifferenz  $\Delta T_{PR}$  kann gemessen werden (Wärmestrom-DSC) oder sie ist mit einem Regelkreis verknüpft, der die durch eine Probenreaktion auftretenden Temperaturdifferenzen über eine Änderung der Heizleistung des Ofens kompensiert (Leistungskompensations-DSC). Dabei wird die Heizleistung so geregelt, dass sich die Proben- und Referenztemperatur mit der vorgewählten Heizrate ändern.

Kristalline Anteile in festen Dispersionen ergeben in der DSC endotherme Schmelzpeaks, während feste Lösungen keine Peaks zeigen. Aus der Peakfläche kann der Grad der Kristallinität der Probe berechnet werden. Allerdings können Kristallkonzentrationen unter 2 % nicht mithilfe der DSC detektiert werden.

#### 3.2.2.4.2 Thermomikroskopie

Die Thermomikroskopie oder sogenannte Hot Stage Microscopy (HSM) zählt ebenfalls zu den Methoden der thermischen Analyse. Sie stellt ein thermooptisches Verfahren dar und ist eine Methode, bei der eine Probe, die einem Temperaturprogramm unterworfen ist, mikroskopisch beobachtet wird (Hemminger & Cammenga 1989). Optische Eigenschaften können in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt werden.

Besonders geeignet ist die Thermomikroskopie für kristallines Material, denn seine optischen Eigenschaften sind häufig temperaturabhängig. Dabei können vor allem Vorgänge

beobachtet werden, die mit einer Änderung der Korngröße verbunden sind, wie z.B. Schmelz-, Auflösungs- und Keimbildungsvorgänge einschließlich der Keimwachstumsgeschwindigkeit. Die Detektion kleinster Mengen kristallinen Materials ist möglich. Beim Vorliegen einer festen Lösung schmilzt die gesamte Probe gleichzeitig, während bei einer festen Dispersion Teilbereiche getrennt schmelzen.

Die Messausrüstung besteht zusätzlich zu den Bestandteilen eines Polarisationsmikroskops aus einer Heiz- oder Temperiertvorrichtung, die sich zwischen Objektiv und Objekttisch befindet und in der die Probe bei gleichzeitiger Beleuchtung dem Temperatur-Zeit-Programm unterworfen wird. Damit kann die Thermomikroskopie eine sinnvolle Hilfe zur Interpretation von DSC-Kurven bilden.

## 4 Kalorimetrie

Die Kalorimetrie ist eine thermoanalytische Methode zur quantitativen Bestimmung von Wärmemengen und Wärmeflüssen. Es handelt sich dabei um eine allgemeine Methode, die die entwickelte oder absorbierte Wärme von sehr komplexen Systemen misst (Buckton & Beezer 1991). Zu beachten ist, dass es sich hierbei um eine unspezifische Messung handelt, da jede im Reaktionsgefäß entstehende bzw. verbrauchte Wärme gemessen wird. Die registrierte Gesamtwärmemenge ist dabei aus exothermen und endothermen Vorgängen zusammengesetzt. Endotherme Reaktionen bewirken einen negativen Wärmefluss, d.h. von der Probe wird Wärme aufgenommen, die der Umgebung entzogen wird. Dazu zählen z.B. Wasserverdampfung, Wasserumverteilung und Änderungen in der Kristallstruktur. Exotherme Reaktionen entwickeln dagegen Wärme und ergeben damit einen positiven Wärmefluss. Zersetzungsreaktionen, wie die Arzneistoffhydrolyse, verlaufen meist exotherm. Im seltenen Fall kann es zu einer Überlagerung einer exothermen und einer endothermen Reaktion kommen, die sich gerade ausgleichen und so Stabilität vortäuschen. Der erhaltene Messwert wäre dann Null.

Die meisten Prozesse, ob physikalischer, chemischer oder biologischer Natur, sind von einem Wärmetransfer begleitet. Die Wärmemenge  $Q$  wird durch die Art und das Ausmaß des Prozesses bestimmt (Spink & Wadsö 1976). Die Reaktionsgeschwindigkeit ist zu jedem Zeitpunkt zum Wärmefluss  $dQ/dt$  proportional. Mithilfe der Kalorimetrie ist also die Ermittlung thermodynamischer sowie kinetischer Daten für einzelne Prozesse möglich.

In der Thermodynamik werden Zustände und die energetischen Veränderungen im Verlauf von Prozessen erfasst (Selzer 1998). Die Energieänderung wird dabei als Unterschied zwischen Anfangs- und Endwert betrachtet, sodass die Thermodynamik die Triebkraft für chemische oder physikalische Prozesse darstellt. Die Thermodynamik entscheidet primär über die Lage des Gleichgewichtes im Gleichgewichtszustand. Die Kinetik dagegen beschreibt den zeitlichen Ablauf der Prozesse, d.h. die Geschwindigkeit, mit der der Gleichgewichtszustand erreicht wird. Dabei spielt die Höhe der Aktivierungsenergie und die Messtemperatur eine entscheidende Rolle, wie schnell der Gleichgewichtszustand erreicht wird. Bei den meisten Reaktionen nimmt die Geschwindigkeit zu, wenn man die

Temperatur erhöht, wobei die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten um so stärker ist, je größer die Aktivierungsenergie ist (Arrhenius-Gleichung, Gl. 18).

Bei der Beschreibung der Stabilität eines Systems ist demnach zwischen der thermodynamischen und der kinetischen Stabilität zu unterscheiden. Ein thermodynamisch stabiles System befindet sich auf dem minimalsten Energieniveau und besitzt keine Triebkraft für eine weitere Änderung. Ist ein System dagegen thermodynamisch instabil und befindet sich in einem relativen Energieminimum, so strebt es das Erreichen des Gleichgewichtszustandes unter Energieabgabe an. Die Geschwindigkeit, mit der diese Stabilität erreicht wird, ist durch die kinetischen Parameter der Reaktion beschrieben. Manche Vorgänge laufen spontan von selbst ab, andere nicht. Wandelt sich ein thermodynamisch instabiles System nicht in die stabile Struktur um, so handelt es sich um ein kinetisch stabiles System. Man spricht in diesem Fall von metastabilen Zuständen. Sie sind so lange stabil und täuschen ein Gleichgewicht vor, bis die Aktivierungsenergie aufgebracht und die Energiebarriere für die Umwandlung überwunden wird (Hemminger & Höhne 1979). Um die Stabilität eines Systems zu beurteilen, muss man also sowohl die thermodynamische als auch die kinetische Triebkraft berücksichtigen.

## **4.1 Physikalische Grundlagen der Kalorimetrie**

### **4.1.1 Wärme**

Wärme  $Q$  ist die Energiemenge, die als Folge einer Temperaturdifferenz  $\Delta T$  zwischen einem System und seiner Umgebung durch thermischen Kontakt ausgetauscht wird (Atkins 1990). Der Wärmeaustausch findet über einen Wärmefluss  $dQ/dt$  statt und entspricht der zeitlichen Ableitung der übertragenen Wärme  $Q$ . Behälter, die einen Wärmeübergang zulassen, werden diathermisch genannt, solche, die einen Wärmeübergang verhindern, adiabatisch.

Durch Wärmeaustausch ändert sich also die Energie des Systems. Wird ihm Energie in Form von Wärme zugeführt, so kann die Änderung als Temperaturanstieg  $\Delta T$  in Erscheinung treten, der proportional der zugeführten Wärmemenge  $\Delta Q$  und umgekehrt proportional zur Wärmekapazität  $C_K$  des Systems bzw. Kalorimeters ist (Gl. 4).

$$\Delta Q = C_K \cdot \Delta T \quad \text{Gl. 4}$$

Die Wärmekapazität  $C_K$  eines Kalorimeters ist ein Gerätefaktor und setzt sich aus der Summe der Wärmekapazitäten der Kalorimetersubstanz und der an der Temperaturänderung ganz bzw. teilweise teilnehmenden weiteren Bestandteile der Messeinrichtung (Rührer, Thermometer, Wandung) zusammen (Hemminger & Höhne 1979). Sie gibt diejenige Wassermenge an, die dieselbe Wärmekapazität hat wie die Kalorimeterbestandteile. Je höher die Wärmekapazität der Bestandteile des Kalorimeters ist, umso mehr Wärme muss das Kalorimeter aufnehmen, bis man eine Temperaturerhöhung um 1 K beobachtet. Eine hohe Wärmekapazität bedeutet also eine geringe Empfindlichkeit des Kalorimeters und umgekehrt.

#### **4.1.2 Innere Energie**

Die Gesamtenergie aller Teilchen einer Probe wird Innere Energie  $U$  genannt (Atkins 1990). Sie enthält die Energie der Bindungen, Translationsbewegungen, Rotationen, Schwingungen der Moleküle und der intermolekularen Wechselwirkungen. Die Innere Energie  $U$  ist eine Zustandsgröße, da sie bei gleichen Eigenschaften unabhängig davon, wie dieser Zustand erreicht wurde, immer gleich groß ist. Sie ist abhängig vom physikalischen Zustand, der Temperatur, dem Druck sowie der Stoffmenge.

Die Innere Energie eines Systems kann verändert werden, indem man aus der Umgebung Energie zuführt oder Energie entnimmt. Nimmt die Innere Energie unter Wärmeaufnahme zu, so ist  $\Delta U$  positiv, nimmt die Innere Energie dagegen unter Wärmeabgabe ab, so ist  $\Delta U$  negativ. Verändert das System seinen Zustand durch Wärmeübertragung, so setzt sich die Änderung der Inneren Energie  $\Delta U$  aus der beim Prozess aufgenommenen Wärme  $Q$  und der geleisteten Arbeit  $W$  zusammen (Gl. 5).

$$\Delta U = Q + W = Q + p\Delta V \quad \text{Gl. 5}$$



Die bei konstantem Volumen ( $\Delta V = 0$ ) übertragene Wärme ist gleich der Änderung der Inneren Energie des Systems (Gl. 6).

$$\text{Bei konstantem Volumen: } Q = \Delta U \quad \text{Gl. 6}$$

### 4.1.3 Enthalpieänderung

Als Enthalpieänderung  $\Delta H$  wird die bei konstantem Druck unter Volumenänderung aufgenommene Wärmemenge bezeichnet (Atkins 1987). Wenn ein System bei konstantem Druck erwärmt wird und wenn außer Volumenarbeit keine andere Form der Arbeit zugelassen ist, so nimmt  $H$  um einen Betrag zu, der gleich der als Wärme zugeführten Energie ist (Gl. 7).

$$\text{Bei konstantem Druck : } Q = \Delta H \quad \text{Gl. 7}$$

Wenn eine bestimmte Wärmemenge bei konstantem Druck zugeführt wird, ist daher der Temperaturanstieg kleiner, als wenn die gleiche Wärmemenge dem System bei konstantem Volumen zugeführt wird. Die Differenz zwischen  $\Delta U$  und  $\Delta H$  entspricht der Volumenarbeit  $p\Delta V$ .

Die Änderung der Enthalpie  $\Delta H$  bei einer Reaktion heißt Reaktionsenthalpie. Sie ist von der Temperatur  $T$  und der Änderung der Wärmekapazität bei konstantem Druck  $\Delta C_p$  abhängig (Gl. 8).

$$\Delta H(T_2) = \Delta H(T_1) + \Delta T \cdot \Delta C_p \quad \text{Gl. 8}$$

### 4.1.4 Exotherme und endotherme Reaktionen

Exotherme Reaktionen besitzen eine negative Enthalpie ( $\Delta H < 0$ ). Wärme wird freigesetzt und fließt aus dem System heraus. In einem adiabatischen Behälter kommt es zu einer Temperaturerhöhung. Endotherme Reaktionen dagegen besitzen eine positive Enthalpie

( $\Delta H > 0$ ). Wärme fließt in das System hinein bzw. in einem adiabatischen Behälter kommt es zu einer Temperaturniedrigung.

## 4.2 Klassifikation der Kalorimeter

Bei jedem Kalorimeter kann man zwischen dem eigentlichen Probensystem und dessen Umgebung unterscheiden. Das Probensystem ist dabei an der Probenreaktion beteiligt, während die Umgebung die Betriebsart festlegt. Die Umgebung ist wiederum von der Außenwelt abzugrenzen, die die kalorimetrische Messung nicht beeinflussen sollte.

Die kommerziellen Kalorimeter können entsprechend ihrem Messprinzip und ihrer Betriebsart nach Abb. 4.1 eingeteilt werden.

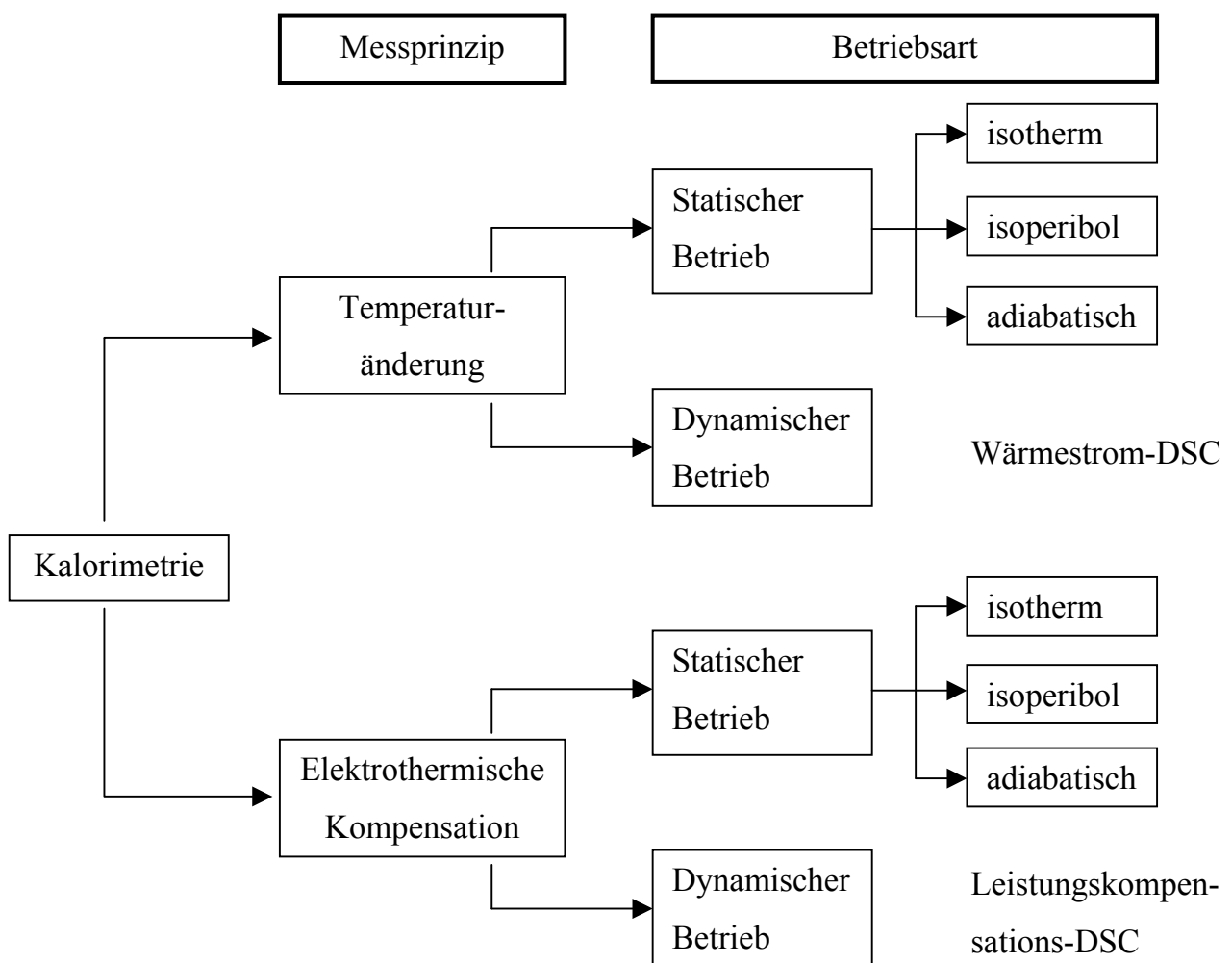


Abb. 4.1. Klassifikation der Kalorimeter (nach Hemminger & Höhne 1979).

### 4.2.1 Betriebsart

Die Umgebungsbedingungen sowie die thermischen Wechselwirkungen zwischen Umgebung und Probensystem legen die Betriebsart eines Kalorimeters fest. Ein dynamischer Betrieb liegt vor, wenn eine von außen vorgegebene, kontrollierte Temperaturerhöhung der Umgebung oder des Probensystems vorgenommen wird. Werden die Temperaturbedingungen nur durch die Probe selbst bestimmt, so handelt es sich um die statische Betriebsart.

Je nach den Wechselwirkungen zwischen Umgebung und Probensystem kann man zwischen isothermer, isoperiboler und adiabatischer Betriebsart unterscheiden.

#### 4.2.1.1 Isothermes (wärmeleitendes) Kalorimeter

Bei isothermer Betriebsart sind die Temperaturen von Umgebung und Probensystem gleich und konstant, d.h.  $T_U = T_M = \text{konstant}$ . Im Idealfall muss die bei einer Reaktion entstehende Wärme bei konstanter Temperatur vollständig auf die Umgebung übertragen bzw. die benötigte Energie aus der Umgebung geliefert werden (Spink & Wadsö 1976).

Die Entstehung von Reaktionswärme ist allerdings mit einer Temperaturerhöhung im Reaktionsgefäß verbunden. Soll eine Temperaturerhöhung der reagierenden Substanz bei der Messung vermieden werden, dann muss die Wärme sofort nach Entstehen durch einen geeigneten Wärmeleiter in den Thermostaten mit unendlicher Wärmekapazität (Heat sink) strömen, sodass die Temperatur des Thermostaten dabei weitgehend konstant bleibt (Hemminger & Höhne 1979).

Strenge Isothermie ist in der Kalorimetrie allerdings nicht realisierbar, da unter streng isothermen Bedingungen keine Wärme fließen könnte. In der Praxis tritt eine geringe Temperaturdifferenz zwischen Reaktionsgefäß und Umgebung auf, die von der pro Zeiteinheit abgegebenen Wärmemenge abhängt (Hemminger & Höhne 1979). Ein ideal isothermer Betrieb wäre nur möglich, wenn der Messeffekt durch thermoelektrische Effekte im Reaktionsgefäß vollständig kompensiert würde. Aber auch jeder Regler braucht eine geringe Sollwertabweichung um aktiv zu werden.

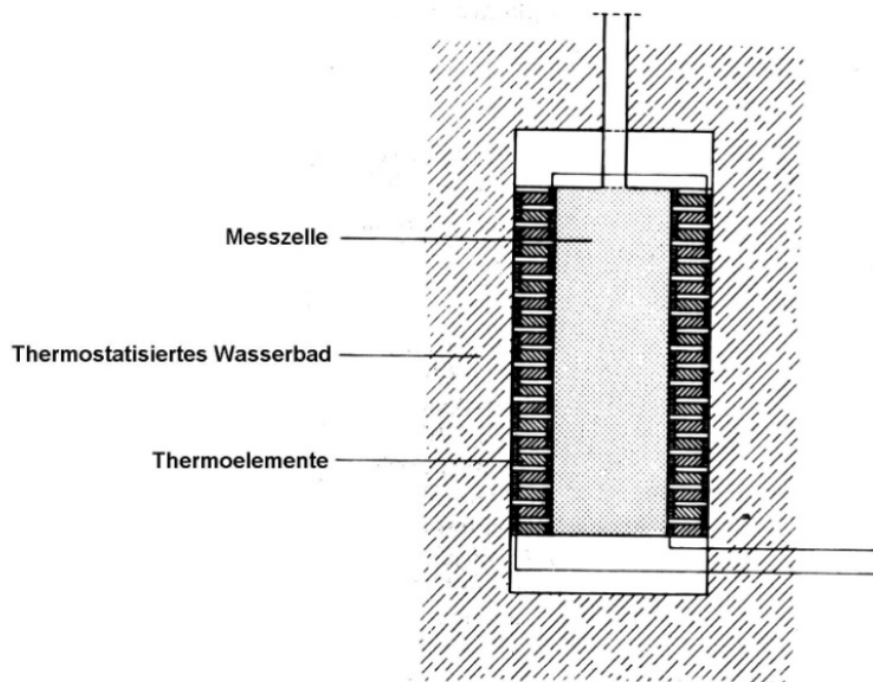


Abb. 4.2. Allgemeiner Aufbau des isothermen Wärmeleitungs-Kalorimeters (nach Spink & Wadsö 1976).

Ein Wärmeaustausch zwischen Kalorimetergefäß und der Umgebung ist beim isothermen Betrieb unbegrenzt möglich, denn der Wärmewiderstand  $R_{th}$  zwischen Messzelle und Umgebung ist verschwindend gering. Der kontrollierte Transfer der Wärme in die Umgebung wird durch den Einbau von Thermoelementen in die Wand der Messzelle erreicht (Abb. 4.2). Die Thermoelemente sind in Reihe geschaltet und messen eine der entstehenden Temperaturdifferenz  $\Delta T$  bzw. dem entstehenden Wärmefluss  $dQ/dt$  entsprechende Spannung  $U$ . Dabei steigt die Spannung der Thermoelemente mit der Anzahl der Thermopaare  $n$ , was die Geräteempfindlichkeit erhöht (Gl. 9). Die Verwendung einer großen Anzahl von Thermoelementen bewirkt eine Verringerung des Wärmewiderstandes  $R_{th}$  und damit eine geringere Temperaturdifferenz  $\Delta T$  bei konstanter Empfindlichkeit, da sich die Thermospannung entsprechend vergrößert. Der Seebeck-Koeffizient  $e$  ist abhängig vom Material der Thermoelemente und stellt eine thermoelektrische Konstante dar.

$$U = n \cdot e \cdot \Delta T \quad \text{Gl. 9}$$

Die Temperaturdifferenz wird durch Wärmeleitung ausgeglichen. In der Praxis geht ein Teil des Wärmeflusses nicht durch Wärmeleitung über die Thermoelemente, sondern über andere Verteilungsmechanismen, wie Luftlöcher, konstruktionsbedingte Materialien oder das Isoliermaterial der Thermoelemente, in die Umgebung. Der Teil des Wärmeflusses, der durch die Thermoelemente fließt, kann mit dem anderen Teil assoziiert werden, weil beide proportional zur Temperaturdifferenz  $\Delta T$  des Probensystems sind.

Die gemessene Spannung  $U$  ist durch eine gerätespezifische Kalibrierkonstante  $\varepsilon$  mit dem entstehenden Wärmefluss  $dQ/dt$  verknüpft (Gl. 10).

$$U = \varepsilon \cdot dQ/dt \quad \text{Gl. 10}$$

Die entwickelte Wärme  $Q$  ist zur Fläche unter der Spannungs-Zeit-Kurve proportional, d.h. das Zeitintegral  $]t_a, t_e[$  über das Spannungssignal  $U$  ist proportional zur entwickelten Wärmemenge  $Q$  der Reaktion (Gl. 11).

$$Q = \frac{1}{\varepsilon} \int_{t_a}^{t_e} U \cdot dt \quad \text{Gl. 11}$$

Da der Wärmefluss dem chemischen Umsatz proportional ist, kann in einem isothermen Kalorimeter durch Spannungsmessung die Reaktionsrate zeitabhängig verfolgt werden, woraus Rückschlüsse auf die Kinetik der Reaktion möglich sind. An dem Punkt, an dem der Wärmefluss bzw. die gemessene Spannung nach einem thermischen Ereignis wieder Null erreicht, wurde die gesamte Wärme an das Wasserbad abgeführt. Bei langsamen Prozessen erreicht das Wärmefluss-signal nur langsam das Steady State.

Nachdem eine schnelle Reaktion im Kalorimeter stattgefunden hat, erreicht die Spannung schnell ihr Maximum, aber es wird eine gewisse Zeit benötigt, bis sich die Nulllinie wieder einstellt. Die Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes beträgt bis zu einer Stunde. Für schnelle Prozesse erhält man also eine signifikante Verzerrung der Wärmefluss-Zeit-Kurve relativ zu der wahren kinetischen Kurve, sodass Wärmeleitungskalorimeter an vergleichsweise langsame Reaktionen gebunden sind.

#### 4.2.1.2 Isoperiboles Kalorimeter

Unter isoperiboler Betriebsart (Abb. 4.3) versteht man den Betrieb eines Kalorimeters in temperaturkonstanter, gut wärmeleitender Umgebung bei möglicherweise unterschiedlicher Temperatur des Probensystems (Hemminger & Höhne 1979). Im Gegensatz zum isothermen Kalorimeter, in dem der Wärmewiderstand  $R_{th}$  zwischen Probensystem und Umgebung verschwindend klein ist, hat der Widerstand  $R_{th}$  im isoperibolen Fall eine endliche Größe (Gl. 12). Durch die entstehende Wärme  $Q$  kommt es im Kalorimeter zu einer Temperaturdifferenz  $\Delta T$ , sodass ein Wärmeaustausch mit der isothermen Umgebung stattfindet.

$$Q = \frac{1}{R_{th}} \int_{t_a}^{t_e} \Delta T(t) dt \quad \text{Gl. 12}$$

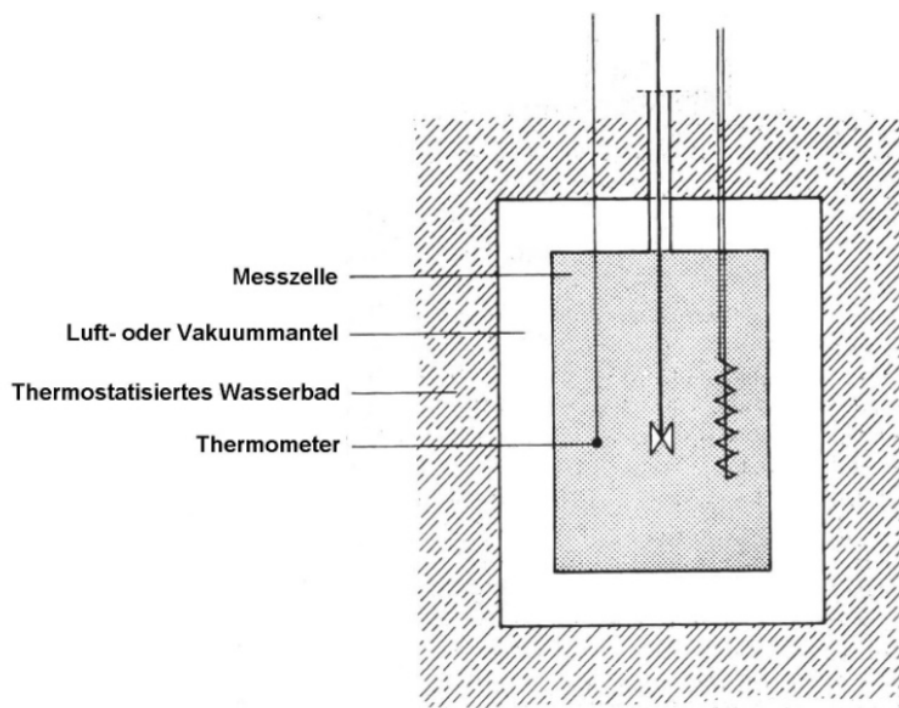


Abb. 4.3. Allgemeiner Aufbau des isoperibolen Kalorimeters (nach Spink & Wadsö 1976).

Der Wärmeaustausch ist von der Temperaturdifferenz  $\Delta T$  zum Probensystem abhängig. Die Temperatur des Probensystems ändert sich so lange, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat.

Bei allen heutigen Wärmeleitungskalorimetern dominiert zwar der Wärmeaustausch über Festkörperleitung, ein Austausch über Strahlung und Konvektion findet jedoch ebenfalls statt. Ihre Anteile hängen in der relativen Größe vom Temperaturunterschied  $\Delta T$  zwischen Probensystem und Umgebung ab. Mit wachsendem  $\Delta T$  wird der durch den Wärmewiderstand fließende Anteil linear mit  $\Delta T$  zunehmen, der durch Strahlung ausgetauschte Anteil nimmt jedoch stärker als linear mit  $\Delta T$  zu. Dies hat einen von  $\Delta T$  abhängigen Gerätefaktor  $K(T)$  zur Folge, da die relativen Anteile der einzelnen Wärmetransportmechanismen vom Wärmefluss-Zeit-Verlauf der Probe abhängig sind (Hemminger & Höhne 1979). Es ist also anzustreben, dass die Wärmeleitung so dominiert, dass die Änderung der relativen Anteile der anderen Wärmetransportmechanismen vernachlässigt werden kann. Der Wärmewiderstand zwischen Probe und Umgebung darf dabei eine Maximalgröße nicht überschreiten.<sup>2</sup>

Ist die „Verlustwärme“ in reproduzierbarer Weise vom Temperaturunterschied  $\Delta T$  zwischen Probensystem und Umgebung abhängig, so kann die entwickelte Wärmemenge (Gl. 13) mittels Kalibrierung und Bestimmung eines Gerätefaktors  $K(T)$  genau bestimmt werden (Hemminger & Höhne 1979).

$$Q = K(T) \int_{t_a}^{t_e} \Delta T(t) dt \quad \text{Gl. 13}$$

#### 4.2.1.3 Adiabatisches Kalorimeter

Beim adiabatischen Kalorimeter wird durch geeignete Maßnahmen Sorge getragen, dass kein Wärmeaustausch zwischen dem Kalorimetergefäß und der Umgebung stattfindet (Spink & Wadsö 1976, Hemminger & Höhne 1979). Um diese Forderung zu erfüllen, gibt es verschiedene Möglichkeiten.

---

<sup>2</sup> Bei isothermem Betrieb ist der Wärmewiderstand  $R_{th}$  so gering, dass die gesamte zu messende Wärme in kurzer Zeit zur Umgebung fließt und die Lecks vernachlässigbar werden.

Der Wärmewiderstand zwischen Probensystem und Umgebung sollte unendlich groß sein, d.h. die Systeme sind vollständig thermisch isoliert (Abb. 4.4). Ein solcher Widerstand ist praktisch nicht zu realisieren. Die Probenreaktion müsste so schnell ablaufen, dass während der Messzeit keine Wärmemenge zu- oder abgeführt wird. Ist dies nicht der Fall, so muss sich das Kalorimetergefäß in einer Umgebung mit exakt gleicher Temperatur befinden und die Umgebung muss die Temperaturänderungen des Probensystems gut geregelt mitvollziehen. Die Temperaturdifferenz wird dabei durch Thermoelemente gemessen und automatisch auf Null geregelt (Spink & Wadsö 1976). Nur dann kann man sicher sein, dass ein Wärmeaustausch mit der Umgebung auf ein Minimum reduziert ist (Hemminger & Höhne 1979). Bei langsamen und mittelschnellen Reaktionen ist dieser Ausgleich kein Problem. Schwierigkeiten entstehen bei raschen Temperaturänderungen. Anwendung findet diese Methode deshalb vor allem bei langsamen und langdauernden Reaktionen.

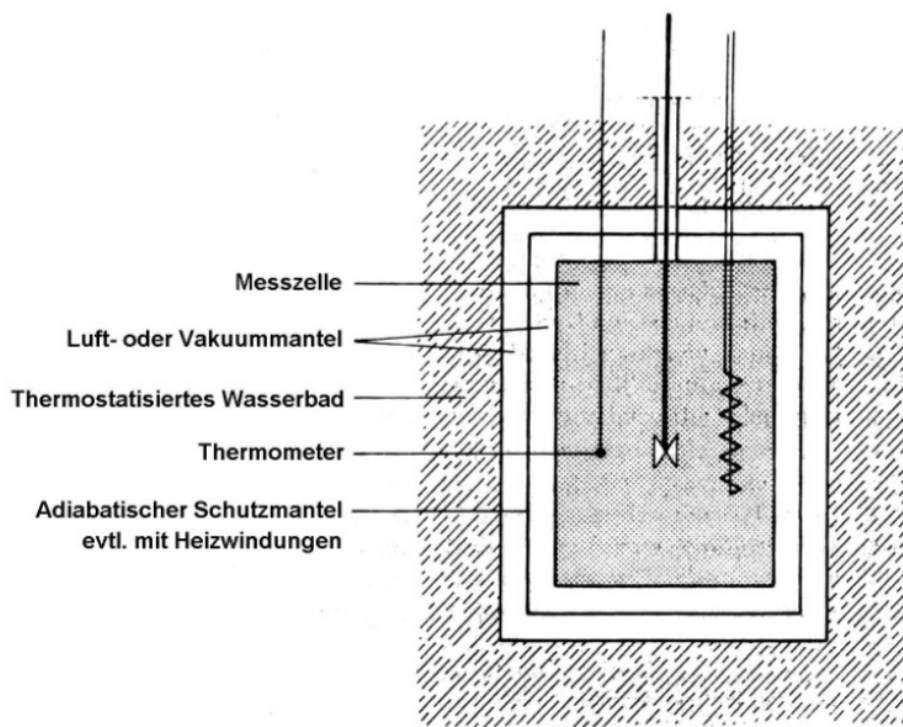


Abb. 4.4. Allgemeiner Aufbau des adiabatischen Kalorimeters (nach Spink & Wadsö 1976).

Die Wärmemenge  $Q$ , die während des Versuchs abgegeben oder aufgenommen wird, ergibt also eine Temperaturerhöhung  $\Delta T$ , die umgekehrt proportional zur Wärmekapazität des Kalorimeters ist (Gl. 4). Die Kalibrierkonstante  $\varepsilon$  entspricht der Wärmekapazität für das



gesamte Kalorimetersystem (Gl. 14). Die Temperaturänderung kann durch Thermoelemente gemessen werden.

$$Q = \varepsilon \cdot \Delta T \quad \text{Gl. 14}$$

## 4.2.2 Messprinzip

### 4.2.2.1 Messung einer Temperaturdifferenz

Die Entstehung von Reaktionswärme ist immer mit einer Temperaturerhöhung im Reaktionsgefäß verbunden, die direkt mithilfe eines Thermometers gemessen werden kann. Infolge der Wärmeentwicklung kommt es jedoch zu einem Energieaustausch mit der Umgebung, was wiederum mit einer Temperaturänderung der Umgebung verbunden sein kann. Die entwickelten Wärmemengen können also durch Bestimmung von Temperaturunterschieden ermittelt werden.

#### 4.2.2.1.1 Messung einer zeitlichen Temperaturdifferenz

Bei der Messung einer zeitlichen Temperaturdifferenz wird der Umgebung des Reaktionsgefäßes eine Wärmemenge aus dem Reaktionsgefäß zugeführt und die resultierende Temperaturänderung  $\Delta T$  in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Die Wärme sollte möglichst schnell und vollständig in die Umgebung transportiert werden, um eine möglichst große Temperaturänderung zu erreichen.

Ist die zugeführte Wärmemenge bekannt, so lässt sich aus der gemessenen Temperaturänderung die spezifische Wärme der Kalorimetersubstanz bestimmen. Soll die zugeführte Wärmemenge gemessen werden, so muss die Wärmekapazität im Bereich der Messtemperatur bekannt sein (Hemminger & Höhne 1979).

#### 4.2.2.1.2 Messung einer örtlichen Temperaturdifferenz

Die Aufzeichnung einer örtlichen Temperaturdifferenz  $\Delta T$  ist ein wesentliches Klassifikationsmerkmal der Wärmeleitungs-kalorimeter, da stets ein Temperaturgradient

vorhanden sein muss, wenn Wärme ausgetauscht wird (Hemminger & Höhne 1979). Die im Probensystem erzeugte bzw. verbrauchte Wärme führt zunächst zu einer Temperaturänderung gegenüber der Umgebung, wodurch ein Ausgleichsprozess eingeleitet und so lange Wärme mit der Umgebung ausgetauscht wird, bis stationäre oder isotherme Verhältnisse vorliegen. Die Temperaturdifferenz  $\Delta T$ , die beiderseits eines wärmeleitenden Festkörpers mit einem definierten Wärmewiderstand zwischen Kalorimetersystem und Umgebung gemessen wird, ist proportional zum Wärmefluss. Der Festkörper, durch den der ausgleichende Wärmestrom fließt, stellt meist selbst den Temperatur-Differenz-Messfühler dar (Thermoelemente bzw. Thermoelement-Säulen).

Die Wärmeausgleichsprozesse benötigen Zeit, was eine Reduzierung der Signalerfassung der im System ablaufenden Prozesse bedeutet. Die  $\Delta T$ -Kurve muss stets über einen gewissen Zeitraum aufgezeichnet werden. Wegen der Temperaturabhängigkeit der Wärmeleitfähigkeit aller Festkörper ist der Gerätefaktor stets temperaturabhängig.

#### **4.2.2.2 Kompensation des thermischen Effektes**

Soll eine Temperaturdifferenz vermieden werden, so kann die entwickelte Wärme durch drei verschiedene Verfahren kompensiert, d.h. die Temperatur konstant gehalten werden. Die Zufuhr oder Aufnahme von Wärme kann durch Phasenumwandlung, chemische Reaktionswärmen oder thermoelektrische Effekte erfolgen. Dabei ist die zugeführte Energie gleich der Reaktionswärme, aber entgegengesetzten Vorzeichens.

Bereits 1760 erkannte man, dass Wärme, die schmelzendem Eis zugeführt wurde, bei konstanter Temperatur für die Umwandlung von Eis in Wasser verbraucht wurde und die umgesetzte Wärmemenge  $\Delta Q$  durch Bestimmung der Menge des Schmelzwassers bestimmt werden konnte (Hemminger & Höhne 1979). Dieses Prinzip wurde 1780 zur Entwicklung des ersten brauchbaren Eiskalorimeters von Lavoisier und Laplace eingesetzt. Die Versuchstemperatur war hierbei auf die Umwandlungstemperatur festgelegt.

In der zweiten Hälfte des 19. Jhs. wurde die Methode der Kompensation durch chemische Reaktionswärmen entwickelt. Hier wurde zu einer geeigneten Flüssigkeit eine zweite Flüssigkeit so zugegossen, dass die entstehende Reaktionswärme die zu messende Wärme gerade kompensiert. Diese Methode ist heutzutage ohne Bedeutung.

Angewendet wird heute ausschließlich die Kompensation durch thermoelektrische Effekte, die 1901 von Steinwehr zum ersten Mal eingesetzt wurde. Entweder wird über einen Heizwiderstand Wärme zugeführt, um endotherme Effekte zu kompensieren, oder exotherme Effekte werden durch die elektrische Kühlung über den Peltier-Effekt ausgeglichen. Die elektrische Leistung wird so geregelt, dass sich die Temperatur in der Probe bzw. die Temperaturdifferenz zwischen Probe und Umgebung nicht ändert. Werden Spannung  $U(t)$  und Stromstärke  $I(t)$  in jedem Augenblick registriert, so kann die elektrisch erzeugte Kompensationswärme im Zeitintervall  $]t_a, t_e[$  durch Gl. 15 berechnet werden.

$$\Delta Q = \int_{t_a}^{t_e} U(t) \cdot I(t) dt \quad \text{Gl. 15}$$

Der hohen Empfindlichkeit und Genauigkeit dieser Methode steht der relativ hohe Aufwand an Regeltechnik gegenüber, um die Temperatur konstant zu halten bzw. eine Temperaturdifferenz zwischen einem Proben- und einem Referenzgefäß auszugleichen.

### 4.2.3 Bauart

Zusätzlich unterscheidet man die Kalorimeter entsprechend ihrer Bauart in Einfachkalorimeter, die nur eine Messzelle besitzen, und Kalorimeter, die nach dem Zwillingsprinzip arbeiten und bei denen sich zwei symmetrische Probensysteme in einer Umgebung befinden. Hierbei wird eine Probe im direkten Vergleich zu einer unreaktiven Referenz gemessen (Differenzmessung). Die Referenz sollte in allen Eigenschaften, wie Wärmekapazität und Wärmeleitfähigkeit, der zu untersuchenden Probe gleichen, aber sie darf im interessierenden Temperatur- oder Zeitbereich keine Reaktion zeigen. Außerhalb des Reaktionszeitraums sollte das Messsignal dann idealerweise Null sein. Man kann erwarten, dass durch Störungen der Umgebung beide Messzellen in gleichem Ausmaß beeinflusst werden. Deshalb werden, wenn das Differenzsignal der beiden Detektoreinheiten aufgezeichnet wird, Störungen ausgeschaltet. Das Zwillingsprinzip hilft, örtlich homogene Temperaturschwankungen der Umgebung zu eliminieren. Diese Anordnung ist also von entscheidender Bedeutung für Versuche von langer Dauer (Spink & Wadsö 1976, Hemminger & Höhne 1979).

Eine Möglichkeit, die das Zwillingsprinzip bietet, ist, dass man gleichzeitig eine Reaktion in einem Gefäß ablaufen lassen kann und in einem zweiten eine Hintergrundreaktion. Bei Versuchen mit Zellsuspensionen ist es so möglich, die Zugabe eines Reagenzes mit einer Referenzprobe, in der der Basismetabolismus aufgezeichnet wird, direkt zu vergleichen. Diese Methode ist zeitsparend, aber oft wird dadurch weniger Information als bei zwei getrennten Einzelversuchen erhalten.

Neben diesen Kriterien kann man des Weiteren zwischen Batch- und Durchflusskalorimetern sowie Kalorimetern mit geschlossener oder offener Messzelle differenzieren, wobei entweder bei konstantem Volumen oder Druck gearbeitet wird.

## 5 Reaktionskinetik

Die Mikrokalorimetrie ermöglicht die Bestimmung von kinetischen sowie thermodynamischen Parametern von chemischen Reaktionen und kann angewendet werden, um die Natur der Reaktion, das Geschwindigkeitsgesetz, die Geschwindigkeitskonstante  $k$ , die Aktivierungsenergie  $E^*$  und die Reaktionsenthalpie  $\Delta H$  zu bestimmen (Angberg & Nyström 1988, Angberg et al. 1990 & 1993, Willson et al. 1995a, 1995b & 1996). Die kinetische Messung des Wärmeflusses  $dQ_t/dt$  wird durch die Entstehungsgeschwindigkeit des Zersetzungsproduktes bestimmt (Gl. 17), während der thermodynamische Parameter der Wärmemenge  $Q$  die Lage des Gleichgewichtes charakterisiert. Ohne Wissen über den Reaktionsmechanismus, die Zersetzungsprodukte und die Reaktionsenthalpie gestattet die Mikrokalorimetrie also die Bestimmung des Ausmaßes von Reaktionen, denn die Wärmemenge  $Q$  ist direkt proportional zur Konzentration der Zersetzungsprodukte (Selzer et al. 1998). Das Verhältnis von Wärmemenge  $Q_t$  zur zersetzten Arzneistoffmenge  $x(t)$  zu einem bestimmten Reaktionszeitpunkt  $t$  ist gleich der Enthalpieänderung der Reaktion  $\Delta H$  (Gl. 16).

$$Q_t = \Delta H \cdot x(t) \quad \text{Gl. 16}$$

Die zeitliche Ableitung der Gl. 16 ergibt, dass der Wärmefluss  $dQ_t/dt$  direkt proportional zur Zersetzungsrate  $dx/dt$  ist.

$$\frac{dQ_t}{dt} = \Delta H \cdot \frac{dx}{dt} \quad \text{Gl. 17}$$

Ist die Reaktionsenthalpie unbekannt, so muss die Menge der Zersetzungsprodukte  $x$  mithilfe einer direkten und spezifischen Methode, wie z.B. der HPLC, quantitativ gemessen werden, um die Fraktion der Zersetzung zu jedem beliebigen Zeitpunkt aus der Mikrokalorimetrie direkt bestimmen zu können (Koenigbauer et al. 1992).

Die Mikrokalorimetrie ist eine Methode, die es erlaubt, die Zerfallsrate von Arzneistoffen als Feststoff, in Lösung oder in der Arzneiform und damit ihre Stabilität zu bestimmen

(Buckton & Beezer 1991, Koenigbauer et al. 1992, Selzer et al. 1998 & 1999). Trotz ihrer hohen Empfindlichkeit, die 10000-fach höher ist als die der konventionellen DSC, sind Instabilitäten häufig nicht bei Raumtemperatur direkt zu bestimmen (Beezer et al. 1999). Reaktionsraten von ein paar Prozent pro Jahr bei Raumtemperatur sind signifikant für die Stabilität, aber auch mit chromatographischen Methoden erst nach langer Lagerdauer detektierbar. Deshalb werden Stabilitätsprüfungen von relativ stabilen Arzneistoffen bei erhöhten Temperaturen durchgeführt (Stresstests), um die Reaktion zu beschleunigen. Die Ergebnisse können anschließend unter Verwendung der Aktivierungsenergie  $E^*$  nach der Arrhenius-Gleichung (Gl. 18) auf Raumtemperatur extrapoliert werden. Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  ist dabei exponentiell von der Temperatur  $T$  abhängig. Die Konstante  $R$  entspricht der allgemeinen Gaskonstante und  $A$  stellt einen preexponentiellen Faktor dar.

$$k = A \cdot e^{-\frac{E^*}{RT}} \quad \text{Gl. 18}$$

Die Stabilitätsprüfung unter beschleunigenden Bedingungen, wie hoher Temperatur und Feuchte, und die anschließende Extrapolation auf Raumtemperatur setzt voraus, dass sich der Reaktionsmechanismus mit der Temperatur nicht ändert. Eine Temperaturerhöhung geht aber häufig mit einer Änderung im Reaktionsmechanismus einher und kann bei Extrapolation der Geschwindigkeitskonstante  $k$  auf Raumtemperatur zu fehlerbehafteten Stabilitätsvorhersagen führen. Hydrate und Arzneistoffe mit ungebundenem Wasser neigen beispielsweise bei höheren Temperaturen zu einem Wasserverlust, wobei Wasser einen wichtigen Faktor, z.B. bei hydrolytischen Zersetzungsreaktionen, darstellt (Beezer et al. 1999). Physikalische Veränderungen in der Arzneiform, wie beispielsweise ein Glasübergang, können die Dateninterpretation zusätzlich erschweren. Die Kinetik bzw. die Aktivierungsenergie für die Zersetzung ändern sich zwischen dem glasförmigen und dem gummiartigen Zustand, wobei der Zerfall oberhalb der Glasübergangstemperatur verstärkt ist (Duddu & Weller 1996).

Die Mikrokolorimetrie kann angewendet werden, um rasch das Geschwindigkeitsgesetz und damit Änderungen im Mechanismus während der Messdauer zu erkennen. Die Messdaten werden dazu in verschiedene Zeitintervalle entlang der Wärmeflusskurve unterteilt und die

kinetischen und thermodynamischen Parameter berechnet. Die berechneten Werte sollten so lange konstant bleiben, wie sich der Reaktionsmechanismus nicht ändert. Änderungen im Mechanismus, führen zu veränderter Geschwindigkeitskonstante und/oder Reaktionsordnung (Willson et al. 1995a & 1995b).

## 5.1 Wärmefluss und Kinetik von chemischen Reaktionen

Zur Bestimmung der Reaktionskinetik von chemischen Zersetzungsreaktionen müssen zunächst einige Größen definiert werden. Dabei ist  $D_0$  die Arzneistoffmenge, die in der Probe zum Zeitpunkt  $t = 0$  vorhanden ist. Da nur ein Teil der Arzneistoffprobe im festen Zustand aktiv sein kann, wird  $\beta$  als die reaktive Arzneistofffraktion bezeichnet, die in einer bestimmten Zeit wirklich reagiert.  $\beta$  kann von Charge zu Charge variieren, häufig sind es nur einige Prozent. Daraus ergibt sich, dass  $\beta D_0$  die Gesamtmenge an Arzneistoff ist, die reagiert (Hansen et al. 1989). Wenn  $\beta D_0$  die Gesamtmenge an reagierendem Arzneistoff darstellt, so wird die bis zum Zeitpunkt  $t = \infty$  entwickelte Gesamtwärmemenge  $Q_\infty$  durch Multiplikation mit der molaren Reaktionsenthalpie  $\Delta H$  erhalten (Gl. 19).

$$Q_\infty = -\Delta H \cdot \beta D_0 \quad \text{Gl. 19}$$

Als  $\alpha_t$  wird die Fraktion der Reaktion bezeichnet, die zur Zeit  $t$  bereits abgelaufen ist. Zur Zeit  $t = 0$  ist  $\alpha_t = 0$  und zur Zeit  $t = \infty$  ist  $\alpha_t = 1$ . Die zum Zeitpunkt  $t$  bereits umgesetzte Arzneistofffraktion  $\alpha_t$  kann nach Gl. 20 als Verhältnis aus der bis zur Zeit  $t$  entwickelten Wärmemenge  $Q_t$  und der Gesamtwärmemenge  $Q_\infty$  der Reaktion berechnet werden.

$$\alpha_t = \frac{Q_t}{Q_\infty} \quad \text{Gl. 20}$$

Aus Gl. 19 und Gl. 20 ergibt sich für die Molmenge des Arzneistoffs  $\alpha_t \beta D_0$ , die zur Zeit  $t$  umgesetzt worden ist, folgende Gleichung (Gl. 21).

$$Q_t = -\Delta H \cdot \beta D_0 \cdot \alpha_t \quad \text{Gl. 21}$$

Die 1. Ableitung der Gl. 21 nach der Zeit  $t$  ergibt die Abhängigkeit des gemessenen Wärmeflusses von der Reaktionsrate (Hansen et al. 1989, Koenigbauer 1994). Der Wärmefluss  $dQ_t/dt$  eines Prozesses ist proportional zu der Reaktionsrate  $d\alpha_t/dt$  (Gl. 22).

$$\frac{dQ_t}{dt} = -\Delta H \cdot \beta D_0 \cdot \frac{d\alpha_t}{dt} \quad \text{Gl. 22}$$

Die Reaktionsrate ist nach Ng (1975) für Feststoffe als Produkt aus der Geschwindigkeitskonstante  $k$  und einer Funktion von  $\alpha_t$  definiert (Gl. 23). Die Konstanten  $x$  und  $y$  sind dabei charakteristisch für den Reaktionsmechanismus.

$$\frac{d\alpha_t}{dt} = k \cdot \alpha_t^{1-x} \cdot (1 - \alpha_t)^{1-y} \quad \text{Gl. 23}$$

Aus Gl. 22 und Gl. 23 ergibt sich für den Wärmefluss

$$\frac{dQ_t}{dt} = -\Delta H \cdot \beta D_0 \cdot \left[ k \cdot \alpha_t^{1-x} (1 - \alpha_t)^{1-y} \right] \quad \text{Gl. 24}$$

Die theoretische Behandlung von kinetischen Daten ist allgemein wesentlich einfacher für Zerfallsreaktionen in Lösung als bei Feststoffen, denn Reaktionen in Lösung folgen meist Gesetzen nullter, erster oder zweiter Ordnung. Feststoffreaktionen dagegen können sehr komplexe Kinetiken haben, wie fraktionelle oder autokatalytische Zerfallsgesetze (Koenigbauer 1994). Die Konstanten  $x$  und  $y$  sind dann nicht streng von der Reaktionsordnung abhängig, sondern es handelt sich um fitting-Parameter mit Bezug auf den Reaktionsmechanismus der Komponente (Willson et al. 1996).

In Abhängigkeit von der Größe der Konstanten  $x$  und  $y$  ergeben sich verschiedene Reaktionstypen, die charakteristische Wärmefluss-Zeit-Kurven zeigen (Abb. 5.1). Wenn sich der Reaktions- bzw. Übergangsmechanismus bei verschiedenen Messtemperaturen nicht verändert, so haben die Kurven eine gleiche Form.

Aussagen über die Reaktionsordnung und die Konstanten  $k$  und  $\Delta H$  können auch über die Darstellung des Wärmeflusses  $dQ_t/dt$  gegen die Wärmemenge  $Q_t$  gemacht werden (Gl. 25).



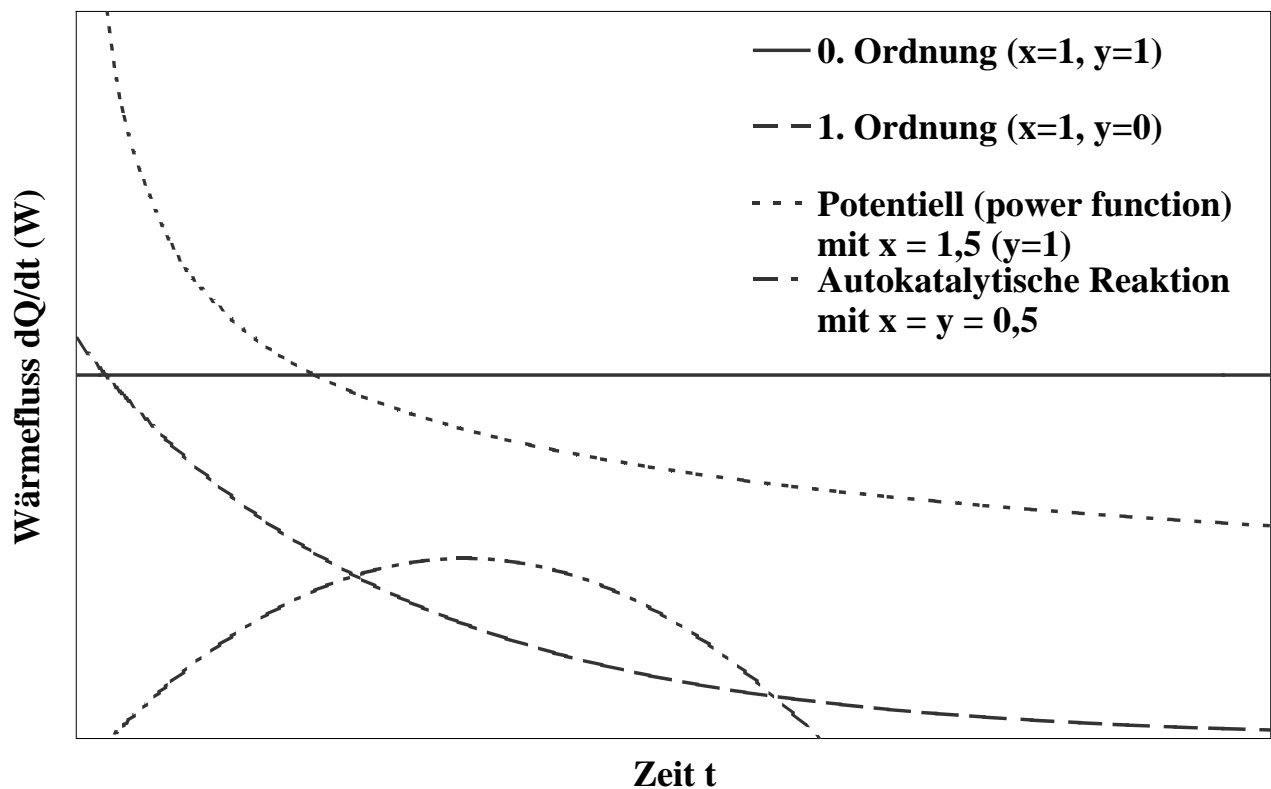


Abb. 5.1. Wärmefluss-Zeit-Kurven für verschiedene Reaktionstypen (nach Hansen et al. 1989).

Aus Gl. 21 und Gl. 24 ergibt sich

$$\frac{dQ_t}{dt} = Q_t \cdot \frac{\left[ k \cdot \alpha_t^{1-x} (1 - \alpha_t)^{1-y} \right]}{\alpha_t} \quad \text{Gl. 25}$$

Bei der Darstellung des Wärmeflusses  $dQ_t/dt$  gegen die Wärmemenge  $Q_t$  führt die Extrapolation auf  $dQ_t/dt = 0$  zur Gesamtwärmemenge  $Q_\infty$ .

### 5.1.1 Reaktionskinetik 0. Ordnung

Eine Reaktionskinetik 0. Ordnung wird für eine Reaktion an der Oberfläche eines Feststoffs, die keine schützende Schicht bildet, erwartet (Hansen et al. 1989). Die Konstanten  $x$  und  $y$  aus Gl. 24 sind definiert als  $x = y = 1$ . Der Wärmefluss ist über die Zeit konstant (Gl. 26).

$$\frac{dQ_t}{dt} = -\Delta H \cdot \beta D_0 \cdot k = \text{konst} \quad \text{Gl. 26}$$

Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  ist, wenn  $\Delta H$  und  $\beta$  nicht temperaturabhängig sind, direkt proportional zum initialen Wärmefluss  $\Phi_0$  (Koenigbauer et al. 1992). Der initiale Wärmefluss folgt dann der Temperaturabhängigkeit der Arrhenius-Gleichung (Gl. 18) (Koenigbauer 1994).

Durch Integration von Gl. 26 erhält man eine lineare Abhängigkeit der entwickelten Wärmemenge  $Q_t$  von der Zeit  $t$  (Gl. 27).

$$Q_t = -\Delta H \cdot \beta D_0 \cdot kt \quad \text{Gl. 27}$$

### 5.1.2 Reaktionskinetik 1. Ordnung

Reaktionen 1. Ordnung zeigen einen exponentiellen Verlauf, wie z.B. Zerfallsreaktionen (Gl. 28). Die meisten metabolischen Vorgänge von Arzneistoffen im Körper verlaufen ebenfalls nach einer Kinetik 1. Ordnung. Allerdings ist diese Reaktionskinetik im festen Zustand sehr selten.

$$[D] = [D_0] \cdot e^{-kt} \quad \text{Gl. 28}$$

Der Wärmefluss ist direkt proportional zur Menge des reagierenden Materials in der Probe. Entsprechend der exponentiellen Abnahme der Arzneistoffkonzentration nimmt auch der Wärmefluss  $dQ_t/dt$  exponentiell über die Zeit  $t$  ab (Gl. 29), wobei  $C$  eine Konstante, die dem initialen Wärmefluss  $\Phi_0$  zur Zeit  $t = 0$  entspricht, und  $k$  die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion darstellt (Willson et al. 1995b).

$$\frac{dQ_t}{dt} = C \cdot e^{-kt} \quad \text{Gl. 29}$$

Durch Logarithmierung der Gl. 29 erhält man bei der Auftragung von  $\ln dQ_t/dt$  gegen  $t$  eine lineare Darstellung (Gl. 30). Die Steigung der Geraden entspricht der negativen Geschwindigkeitskonstante  $-k$  und kann zu deren Berechnung angewendet werden (Angberg & Nyström 1988).

$$\ln \frac{dQ_t}{dt} = \ln C - kt \quad \text{Gl. 30}$$

Die Integration der Gl. 29 im Zeitintervall  $]t_a, t_e[$  führt zur Berechnung der freigesetzten Wärmemenge  $Q_t$  als Funktion von der Zeit  $t$  (Willson et al. 1995b).

$$Q_t = \int_{t_a}^{t_e} C e^{-kt} dt = -\frac{C}{k} (e^{-kt_e} - e^{-kt_a}) \quad \text{Gl. 31}$$

In den Grenzen  $]0, t[$  ergibt sich aus Gl. 31 die vereinfachte Gleichung Gl. 32.

$$Q_t = \int_0^t C e^{-kt} dt = -\frac{C}{k} \cdot (e^{-kt} - 1) \quad \text{Gl. 32}$$

Für eine Reaktionskinetik 1. Ordnung gelten die Werte  $x = 1$  und  $y = 0$  (Hansen et al. 1989). Aus Gl. 24 ergibt sich

$$\frac{dQ_t}{dt} = -\Delta H \cdot \beta D_0 \cdot k \cdot (1 - \alpha_t) \quad \text{Gl. 33}$$

Zu Beginn der Messung ( $\alpha_t = 0$ ) folgt für den initialen Wärmefluss  $\Phi_0$ :

$$\Phi_0 = -\Delta H \cdot \beta D_0 \cdot k = C \quad \text{Gl. 34}$$

Aus den Gleichungen 21, 33 und 34 kann die Beziehung zwischen gemessenem Wärmefluss  $dQ_t/dt$  und der produzierten Wärmemenge  $Q_t$  hergeleitet werden (Gl. 35). Für Reaktionen 1. Ordnung ist die Beziehung zwischen Wärmefluss und Wärmemenge linear.

$$\frac{dQ_t}{dt} = -k \cdot Q_t + C \quad \text{Gl. 35}$$

### 5.1.3 Reaktionskinetik höherer Ordnung

Für potentielle Funktionen (power function) gelten die Konstanten  $x \neq 1$  und  $y = 1$  (Hansen et al. 1989). Aus Gl. 24 ergibt sich

$$\frac{dQ_t}{dt} = -\Delta H \cdot \beta D_0 \cdot k \cdot \alpha_t^{1-x} \quad \text{Gl. 36}$$

$$\frac{dQ_t}{dt} = -\Delta H \cdot \beta D_0 \cdot k (xkt)^{\frac{1-x}{x}} \quad \text{Gl. 37}$$

$$\frac{dQ_t}{dt} = C' \cdot t^{\frac{1-x}{x}} \quad \text{Gl. 38}$$

Durch Umformung von Gl. 38 erhält man die linearisierte Form (Gl. 39). Bei der Darstellung von  $\ln dQ_t/dt$  gegen  $\ln t$  ergibt sich eine Gerade mit der Steigung  $(1-x)/x$  (Hansen et al. 1989).

$$\ln \frac{dQ_t}{dt} = \ln C' + \frac{1-x}{x} \ln t \quad \text{Gl. 39}$$

Durch Integration der Gl. 38 erhält man für die entwickelte Wärme  $Q_t$  im Zeitintervall  $]t_a, t_e[$

$$Q_t = xC' \cdot (t_e^{\frac{1}{x}} - t_a^{\frac{1}{x}}) \quad \text{Gl. 40}$$

Aus den Gleichungen Gl. 38 und Gl. 40 kann die Beziehung zwischen gemessenem Wärmefluss  $dQ_t/dt$  und der produzierten Wärmemenge  $Q_t$  hergeleitet werden (Gl. 41).

$$\frac{dQ_t}{dt} = \frac{C'^x}{x^{1-x}} \cdot Q_t^{(1-x)} \quad \text{Gl. 41}$$

#### 5.1.4 Autokatalytische Reaktion

Autokatalytische Reaktionen besitzen eine Induktionsperiode, deren Dauer in Abhängigkeit vom Material und der Reaktandenkonzentration von Minuten bis zu Jahren reichen kann. Nach der Induktionsperiode steigt die Geschwindigkeit schnell auf das Maximum an. Sie sinkt ab, wenn die Reaktion vollständig ist (Koenigbauer 1994). Autokatalytische Reaktionen treten für gewöhnlich bei Luftoxidationsreaktionen von organischem Material oder bei Reaktionen mit freien Radikalen auf.

Die Variablen  $x$  und  $y$  aus Gl. 24 sind beliebig ( $0 \leq x < 1$  bzw.  $0 \leq y < 1$ ).  $x$  bezieht sich auf die beschleunigende Phase der Reaktion, während  $y$  die verlangsamende Phase charakterisiert.

## 5.2 Kinetik von Kristallisationsreaktionen

### 5.2.1 Kristallisationsmechanismus

Kristallisation beinhaltet den Übergang von einer amorphen zu einer kristallinen Phase. Da der amorphe Zustand verglichen mit dem kristallinen Zustand thermodynamisch instabil ist, besteht die Tendenz zur Konversion in die kristalline Form.

Die Bildung einer neuen kristallinen Phase setzt das Auftreten von winzigen Atom- oder Molekül-Clustern voraus, die bereits in der amorphen Phase existieren, deren Anzahl von der Zeit abhängt und durch die Temperatur verändert werden kann. Ihre Verteilung ist zufällig. Diese Cluster bilden entweder stabile Kristallkeime, wenn sie oberhalb einer kritischen Größe sind, oder sie schrumpfen und verschwinden vollständig (Castro et al. 1999). Wenn die Keimbildung an bereits existierenden Flächen erfolgt, so wird sie als heterogener Keimbildungsprozess bezeichnet.

Die Kristallkeime wachsen durch die Einbindung von benachbarten Atomen bzw. Atom-Clustern und werden zu aktiven Wachstumskeimen der neuen Phase, wobei die Temperatur dabei einen kontrollierenden Faktor darstellt (Avrami 1939). Nach Aktivierung passieren die Wachstumskeime zuerst eine Region mit langsamer Wachstumsgeschwindigkeit, dann folgt eine schnellere, konstante Wachstumsrate und schließlich zum Ende der Transformation wieder eine Verlangsamung. Das Wachstum ist beendet, wenn die wachsenden Keime aufeinander treffen. Eine allgemeine S-Form der Transformations-Zeit-Kurven ist charakteristisch für solche Übergänge (Abb. 5.2).

Die Kristallisationsgeschwindigkeit ist konzentrations- und temperaturabhängig. Wird die Temperatur erniedrigt, so wird auch die Kristallisationszeit verkürzt, bis ein Minimum erreicht ist. Eine weitere Unterkühlung erhöht die Kristallisationszeit wieder in Abhängigkeit von anderen Faktoren, wie der Starrheit der Phasen, wobei die

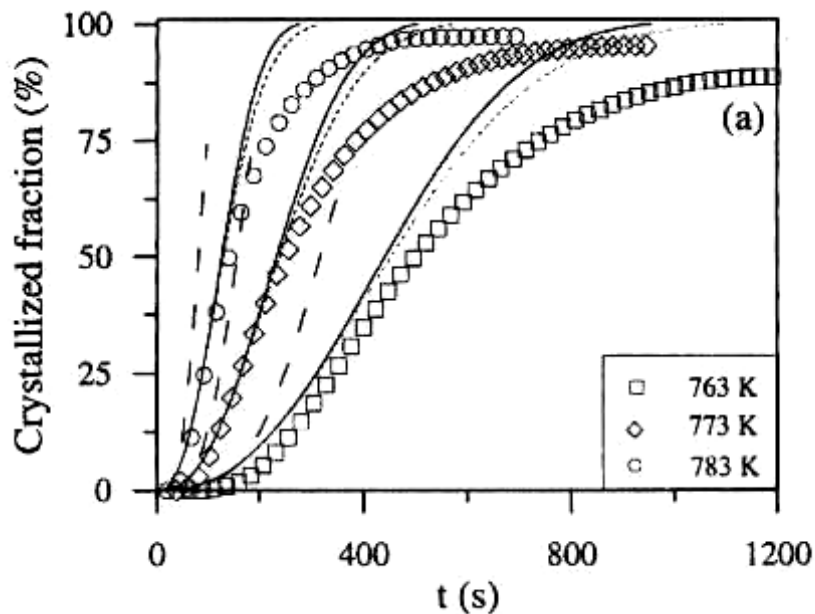


Abb. 5.2. Typische sigmoide Transformationskurve der kristallisierten Fraktion als Funktion der Zeit (aus Pradell et al. 1998).

Partikelbewegung reduziert ist (Avrami 1939). Unterhalb der Glasübergangstemperatur von Polymeren, d.h. im glasartigen Zustand, findet in den Polymeren keine Kristallisation mehr statt.

Wenn Keimbildung und Wachstumsrate nur Funktionen von der Temperatur und nicht zeitabhängig sind, dann können drei verschiedene Mechanismen der Kristallkeimbildung unterschieden werden (Schmitt et al. 1999, Castro et al. 1999). Die Anzahl der Wachstumskeime kann als Funktion von der Zeit beobachtet werden (Avrami 1939).

- Die kontinuierliche Keimbildung (continuous nucleation) verläuft unter isothermen Bedingungen mit konstanter Geschwindigkeit, d.h. die Keime bilden sich ständig und wachsen während des Kristallisationsprozesses.
- Das Wachstum kann sich aber auch an einer festen Anzahl von bereits existierenden Keimen vollziehen, wobei die Keimanzahl unabhängig von den experimentellen Bedingungen ist.
- Die gebietsgesättigte Keimbildung (site saturated nucleation) ist dagegen die Kombination aus den beiden vorhergehenden Arten. Alle Kristallkeime sind zu Beginn des Kristallisationsprozesses vorhanden. Es findet keine weitere Keimbildung während

der Transformation statt, aber die absolute Anzahl der Kristallkeime ist temperaturabhängig. Diese Art der Keimbildung ist am weitesten verbreitet. Wenn die Wachstumsrate wesentlich höher als die Keimbildungsrate ist, wird ebenfalls dieser Mechanismus zugeordnet.

Nach Umwandlung der Kristallkeime in aktive Wachstumskeime kann der Prozess des Kristallwachstums in zwei Schritte unterteilt werden, in die Diffusion von Molekülen durch die Lösung bzw. Matrix zum Kristallkeim und die Adsorption und Inkorporation in das Kristallgitter (Rodríguez-Hornedo & Murphy 1999). Die Aktivierungsenergien für die Diffusion des amorphen Materials zum Kristallkeim und die Oberflächen-Inkorporation sind unterschiedlich (Rodríguez-Hornedo & Wu 1991, Schmitt et al. 1999). Die höhere Aktivierungsenergie stellt den wachstumslimitierenden Faktor dar.

Manchmal verändern sich Keimbildung und Wachstumsgeschwindigkeit mit dem Fortschreiten der Kristallisation. So ist die initiale Wachstumsrate der Kristalle bis zu einem Schwellenradius  $r_T$  häufig oberflächenkontrolliert. Anschließend kann die Diffusion den limitierenden Mechanismus des Kristallwachstums darstellen, denn schreitet die Diffusion weiter fort, so überlappen die Diffusionsprofile der Nachbarkeime in beträchtlichem Ausmaß, was wegen einer Verringerung des Konzentrationsgradienten zu einer Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit führt (Pradell et al. 1998).

Damit einhergehend kann ebenfalls eine reduzierte Keimbildungsrate erwartet werden, weil sich die Zusammensetzung der Matrix während des Kristallisationsprozesses ändert. Die verbleibende amorphe Phase wird zunehmend stabiler gegenüber Kristallisationsprozessen, was zu einer abnehmenden Keimbildungsrate führt (Pradell et al. 1998). Die Keimbildungsrate  $J$  ist nämlich von der Übersättigung  $\sigma$  abhängig (Rodríguez-Hornedo & Murphy 1999), die während des Kristallisationsvorgangs abnimmt.

$$J = N_0 \nu \exp\left(-\frac{4\beta^3 \nu^2 \gamma_{12}^3}{27\alpha^2 (k_B T)^3 \sigma^2}\right) \quad \text{Gl. 42}$$

Die Übersättigung  $\sigma$  ist als natürlicher Logarithmus des Quotienten aus der Konzentration der kristallisierenden Substanz  $C$  und der Löslichkeit  $C_s$  definiert ( $\ln (C/C_s)$ ). Die in Gl. 42 enthaltenen Variablen charakterisieren die Anzahl der Moleküle der kristallisierenden Phase

$N_0$ , die Frequenz des molekularen Transportes an der Grenzflächen zwischen Kristallkeim und Umgebung  $v$ , das molekulare Volumen  $v$  des kristallisierenden gelösten Stoffes, die Grenzflächenenergie  $\gamma_{12}$  zwischen Kristallisationsmedium und gebildetem Kristallkeim, den Flächenformfaktor  $\beta$ , den Volumenformfaktor  $\alpha$  und die Boltzmann-Konstante  $k_B$ .

Häufig erscheinen die Kristallkeime zu Beginn der Kristallisation als Cluster, während andere Regionen vollständig frei von Kristallkeimen sind. Die Ursache hierfür liegt in der niedrigeren Aktivierungsenergie der Kristallkeimbildung bei Clusterbildung (Krüger et al. 1992).

Es existieren verschiedene Kristallwachstumsarten. Sphärisches Wachstum bedeutet eine etwa gleiche Wachstumsgeschwindigkeit der Kristalle in alle Richtungen des Raumes und damit symmetrisches, dreidimensionales Wachstum. Das Wachstum kann aber auch vorrangig in zwei Richtungen bzw. nur entlang einer Richtung erfolgen. Das zweidimensionale Wachstum führt zu plättchenartigen Kristallformen, während das eindimensionale Wachstum auch als geradlinig bezeichnet wird und zu nadelförmigen Kristallen führt. Die unterschiedlichen Kristallformen sind durch verschiedene Verhältnisse der Zeitpunkte, zu denen festgelegte Transformationsgrade erreicht werden, charakterisiert. Ein geeigneter Index ist das Verhältnis von 75 % zu 25 % Transformation  $t_{0,75}/t_{0,25}$  (Tab. 5.1). Wird die Kristallisationsgeschwindigkeit beispielsweise durch Anstieg der Übersättigung erhöht, so ändert sich in den meisten Fällen der Wachstumstyp von polyedrisch zu geradlinig (Avrami 1940).

Vielflächiges Wachstum	$1,48 \leq t_{0,75}/t_{0,25} \leq 1,69$
Plättchenartiges Wachstum	$1,69 \leq t_{0,75}/t_{0,25} \leq 2,2$
Nadelförmiges Wachstum	$2,2 \leq t_{0,75}/t_{0,25} \leq 4,82$

Tab. 5.1. Index für die verschiedenen Kristallwachstumsarten (aus Avrami 1940)



### 5.2.2 Kristallisationskinetik nach Avrami

Im Gegensatz zu den Zersetzungsreaktionen umfassen Feststoffübergänge immer zwei verschiedene Prozesse, Keimbildung und –wachstum. Auch Kristallisationsvorgänge bestehen im Allgemeinen aus diesen beiden Prozessen.

Bei einem Phasenübergang 1. Ordnung wird die Zeitabhängigkeit  $t$  der kristallisierten Fraktion  $x(t)$  im Allgemeinen durch die Avrami-Theorie und die Johnson-Mehl-Avrami (JMA)-Gleichung Gl. 43 beschrieben (Avrami 1940, Graydon et al. 1994, Hutchinson et al. 1989, Maffezzoli et al. 1995, Weinberg et al. 1996, Muraleedharan 1999, Mazzobre et al. 2001, Corrigan et al. 2002). Dabei ist  $n$  der sogenannte Avrami-Exponent und  $k$  die Geschwindigkeitskonstante der isothermen Kristallisation mit der physikalischen Einheit  $[(\text{Zeit})^{-n}]$ , welche vom Exponenten  $n$  abhängig ist.

$$x(t) = 1 - \exp(-kt^n) \quad \text{Gl. 43}$$

Der Avrami-Exponent  $n$  stellt einen charakteristischen Parameter für die Kristallkeimbildung, den Wachstumsmechanismus der Kristalle, die Anzahl der Richtungen, in denen das Kristallwachstum abläuft, und damit auch für die bevorzugte Kristallform dar (Tab. 5.2). Wenn es während der Transformation keine Änderung im Mechanismus gibt, so sollte der Avrami-Exponent während des gesamten Prozesses konstant bleiben. Im Fall von steigenden oder abnehmenden Keimbildungsgeschwindigkeiten bzw. einer Veränderung der Wachstumskontrolle ist der Avrami-Exponent dagegen nicht konstant. Eine klassische Interpretation des Avrami-Exponenten ist jedoch nur möglich, wenn sich der Übergangsmechanismus während der gesamten Transformation nicht ändert.

Die Werte für  $k$  und  $n$  können mithilfe des klassischen doppelt-logarithmischen Ausdrucks der Gl. 43 graphisch bestimmt werden. Die Darstellung von  $\ln[-\ln(1-x(t))]$  gegen  $\ln t$  sollte unter der Voraussetzung, dass keine Änderungen im Kristallisationsmechanismus auftreten, über einen weiten Bereich der Transformation eine Gerade ergeben (Gl. 44). Die Steigung der Gerade entspricht dem Avrami-Exponenten  $n$ .

Kristallkeimbildung Kristallwachstum	kontinuierlich Oberflächen- kontrolliert	kontinuierlich Diffusions- kontrolliert	gesättigt Oberflächen- kontrolliert	gesättigt Diffusions- kontrolliert
Eindimensional	2	3/2	1	1/2
Zweidimensional	3	2	2	1
Dreidimensional	4	5/2	3	3/2

Tab. 5.2. Werte für den Avrami-Exponenten  $n$  abgeleitet für verschiedene Kristallkeimbildungs- und -wachstumsmechanismen (nach Weinberg et al. 1996, Lehto et al. 1998, Pradell et al. 1998)

$$\ln[-\ln(1-x(t))] = n \ln t + \ln k \quad \text{Gl. 44}$$

Die Avrami-Analyse der isothermen Kristallisationsdaten führt zur Berechnung von kinetischen Konstanten mit physikalischen Einheiten, die von den berechneten Avrami-Indices abhängen. Die Darstellung von solchen kinetischen Konstanten ist formal nicht korrekt, weshalb eine Modifikation der Avrami-Gleichung (Gl. 45) angewendet werden sollte (Maffezzoli et al. 1995, Lehto et al. 1998, Vázquez et al. 2000, Ye et al. 2000).

$$x(t) = 1 - \exp[-(k^* t)^n] \quad \text{Gl. 45}$$

Die physikalische Einheit der Kristallisationsgeschwindigkeitskonstante  $k^*$  ist  $[\text{Zeit}^{-1}]$ . Die Werte für  $k$  und  $k^*$  sind unterschiedlich, können aber durch Gl. 46 ineinander überführt werden.

$$k^{1/n} = k^* \quad \text{Gl. 46}$$

### 5.2.3 Kalorimetrische Bestimmung der Kristallisationskinetik

Kristallisationen sind exotherme Übergänge und verlaufen somit unter Wärmeabgabe. Die Gesamtwärme, die bei der Kristallisation eines Stoffes freigesetzt wird, wird als Kristallisationsenthalpie  $\Delta H_{\text{krist}}$  bezeichnet und kann mikrokalorimetrisch gemessen werden (Sebhatu et al. 1994, Aso et al. 1995, Pudipeddi et al. 1995, Lehto et al. 1997, Darcy & Wiencek 1998, Kawakami et al. 2002). Die Kristallisationsenthalpie ist für alle Kristallisationsvorgänge einer Substanz unter isothermen Bedingungen konstant, ändert sich aber mit der Temperatur (Gl. 8).

Der durch die Kristallisation entstehende exotherme Wärmefluss ist von der Kristallisationsgeschwindigkeit abhängig. Die transformierte Fraktion  $x(t)$  ist direkt proportional zur Wärmefreigabe  $Q_t$  (Gl. 20). Sie kann aus der Gesamtwärmemenge  $Q_\infty$  bzw. der Kristallisationsenthalpie  $\Delta H_{\text{krist}}$  berechnet werden. Die Kristallisationsgeschwindigkeit ist durch die Differentialgleichung der JMA-Gleichung Gl. 43 beschrieben.

$$\frac{dx}{dt} = nk \cdot t^{n-1} \cdot e^{-kt^n} \quad \text{Gl. 47}$$

Gl. 48 beschreibt die Abhängigkeit des Wärmeflusses  $dQ_t/dt$  von den Parametern des Kristallisationsvorganges. Eine Linearisierung ist nicht möglich.

$$\frac{dQ_t}{dt} = Q_\infty \cdot nk \cdot t^{n-1} \cdot e^{-kt^n} \quad \text{Gl. 48}$$

$$\ln \frac{dQ_t}{dt} = (n-1) \ln t - kt^n + \ln(nkQ_\infty) \quad \text{Gl. 49}$$

Im Allgemeinen werden zwei Typen für isotherme Kristallisationskurven erhalten (Abb. 5.3), symmetrische und unsymmetrische mit langem Tailing. Das lange Tailing der unsymmetrischen Kurven steht in Beziehung zum diffusionskontrollierten Wachstum, während die symmetrische Kurve typisch für oberflächenkontrolliertes Wachstum ist (Pradell et al. 1998).

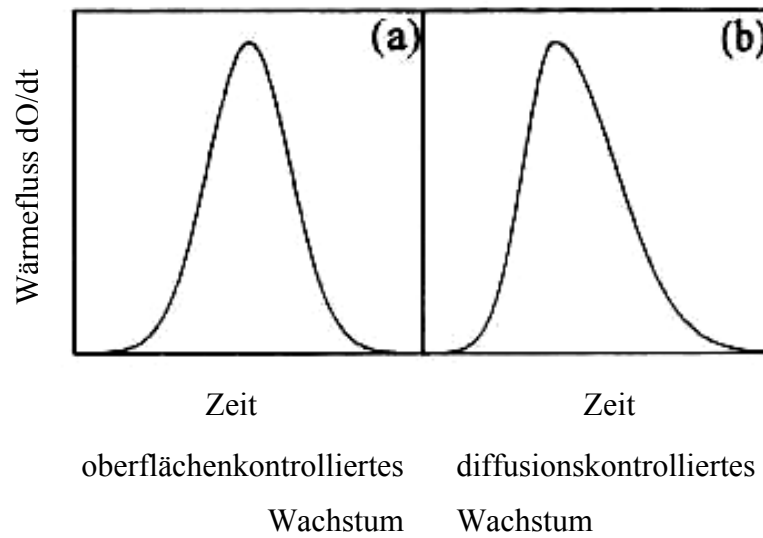


Abb. 5.3. Isotherme kalorimetrische Kurven: (a) symmetrisch für oberflächenkontrolliertes Wachstum und (b) asymmetrisch für diffusionskontrolliertes Wachstum (nach Pradell et al. 1998).



TEIL B

**Praktische Arbeiten**

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Eigenschaften der Arzneistoffe

Für die Untersuchungen wurden die beiden Modellarzneistoffe Estradiol-hemihydrat und Norethisteronacetat verwendet.

#### 6.1.1 17 $\beta$ -Estradiolhemihydrat

##### 6.1.1.1 Eigenschaften

Estradiol-hemihydrat (E2-hemihydrat) ist ein weißes kristallines Pulver, dessen Schmelztemperatur zwischen 175 und 180°C liegt. Die Molare Masse beträgt 281,4 g/mol (Abb. 6.1).

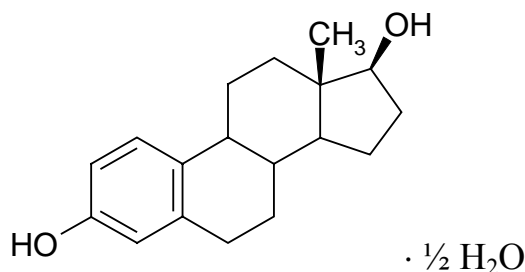


Abb. 6.1. Strukturformel des 17 $\beta$ -Estradiol-hemihydrats (Summenformel: C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub> · ½ H<sub>2</sub>O).

E2-hemihydrat ist praktisch unlöslich in Wasser, löslich in Aceton und wenig löslich in Ethanol (1:28). Je nach Bestimmungsmethode wurden für die Wasserlöslichkeit von Estradiol bei 25°C Werte zwischen 1,3 und 5,0 µg/ml erhalten (Kabasakalian et al. 1966). Die Wasserlöslichkeit ist linear von der Temperatur abhängig (Tab. 6.1).

Bei E2-hemihydrat handelt es sich um ein Estrogen, das im weiblichen Körper reproduktive Aufgaben erfüllt und bei der hormonellen Kontrazeption sowie bei der Hormonersatztherapie in der Postmenopause angewendet wird. Die übliche orale Dosierung

beträgt 1-2 mg pro Tag ( $LD_{50}$  oral: >1000 mg/kg). Zu den bekannten Nebenwirkungen zählen vor allem Übelkeit, Erbrechen, Wasserretention, Hypercalcämie und Leberfunktionsstörungen.

Temperatur (°C)	20	27,5	30	35	40	42,5	50
Löslichkeit (µg/ml)	1,7	3,6		5,6		7,7	9,7
Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (log P)	4,03		3,93		3,78		3,64

Tab. 6.1. Löslichkeit und Verteilungskoeffizient von Estradiol in Wasser (nach Lundberg 1979).

### 6.1.1.2 Kristallformen

$\beta$ -Estradiol kristallisiert in kleinen Prismen, Rechtecken oder Stäbchen und bildet Büschel (Brandstätter-Kuhnert & Kofler 1959).

#### 6.1.1.2.1 Polymorphie

Die Mehrzahl der Sexualhormone ist polymorph, d.h. im festen Zustand bilden sich mehrere Phasen aus, deren Löslichkeit, Schmelztemperatur, Schmelzwärme, Dichte und Lichtbrechung unterschiedlich sind (Kuhnert-Brandstätter & Martinek 1965). In Lösung sind die Eigenschaften dieser Modifikationen allerdings identisch.

Die Anwesenheit von zwei Hydroxylgruppen im Molekül, einer phenolischen und einer alkoholischen, liefert passende Bedingungen für verschiedenartige Wasserstoffbrückenbindungen bei der Molekülassoziation. Die dimere Assoziation zwischen phenolischer und alkoholischer Hydroxylgruppe zeigt die stärkste Bindung, aber auch Bindungen über gleiche Hydroxylgruppen sind möglich. Die Fähigkeit der Moleküle, verschiedene Arten der Wasserstoffbrückenbindung mit vergleichbarer Stabilität zu bilden, kann als Hauptgrund für den Polymorphismus angenommen werden (Smakula et al. 1957).



Auch für  $\beta$ -Estradiol wurden zwei verschiedene Modifikationen gefunden. Die stabile Modifikation I ist die energetisch günstigere. Sie besitzt festere Wasserstoffbrückenbindungen und einen Schmelzpunkt bei 178°C (Kuhnert-Brandstätter & Junger 1967). Der Schmelzpunkt der instabilen Modifikation II liegt dagegen mit 169°C tiefer (Tab. 6.2). Diese Modifikation wird beim Wiedererwärmen einer glasig erstarrten Schmelze auf 110 bis 120°C erhalten.

	$\beta$ -Estradiol	$\alpha$ -Estradiol
(Wasserfreie) polymorphe Formen		
• Modifikation I (stabil)	Smp. 178°C (prismatisch)	Smp. 225°C
• Modifikation II (instabil)	Smp. 169°C (halmförmig)	Smp. 223°C
Solvatbildung mit	$\frac{1}{2}$ Hydrat	$\frac{1}{2}$ Hydrat
	$\frac{1}{2}$ Methanolsolvat	
	1 Ethanolsolvat	

Tab. 6.2. Übersicht über die Kristallformen des Estradiols (nach Kuhnert-Brandstätter & Winkler 1976, Variankaval et al. 2000).

#### 6.1.1.2.2 Pseudopolymorphie

Neben der echten Polymorphie neigen einzelne Sexualhormone des Weiteren zur Ausbildung von lösungsmittelhaltigen pseudopolymorphen Kristallformen, sogenannter Solvatbildung. Welches Solvat gebildet wird, hängt vom Lösungsmittel und dessen Reinheit ab (Kuhnert-Brandstätter & Grimm 1968a). Beim Kristallisieren aus organischen Lösungsmitteln mit geringem Wassergehalt können die Kristalle entweder mit dem organischen Lösungsmittel oder mit Wasser kristallisieren. Für die Kristallisation von  $\beta$ -Estradiol aus 30 verschiedenen Lösungsmitteln wurden lösungsmittelhaltige Komplexe gefunden (Kuhnert-Brandstätter & Grimm 1968a und 1968b). Jedoch ist auffallend, dass der Habitus und die IR-Spektren dieser Pseudopolymorphe sehr ähnlich ist (Abb. 6.2).

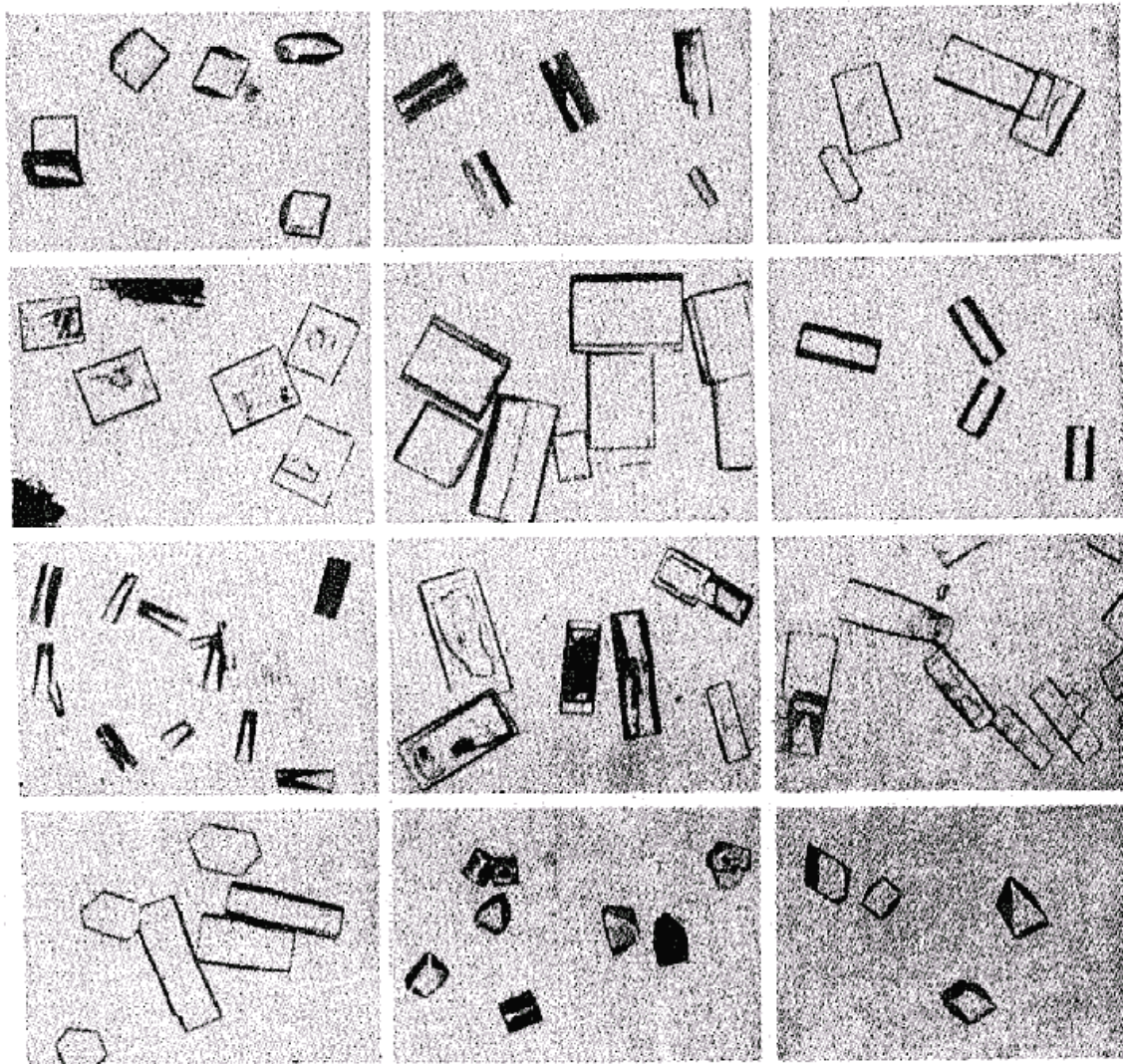


Abb. 6.2. Pseudopolymorphe Kristalle des  $\beta$ -Estradiols kristallisiert aus zwölf verschiedenen organischen Lösungsmitteln (jeweils von links nach rechts): 1. Reihe mit Methanol, Ethanol und n-Propanol, 2. Reihe mit Isopropanol, n-Hexanol und Essigsäure, 3. Reihe mit Methyl-Isobutylketon, Ether und Dioxan, 4. Reihe mit Tetrahydrofuran, Benzol und Chlorbenzol (aus Kuhnert-Brandstätter & Grimm 1968b).

Bei den Steroidhormonen bilden sich bevorzugt Hydrate und auch aus einem wasserfreien, organischen Lösungsmittel kann das Hydrat auskristallisieren.  $\beta$ -Estradiol besitzt eine so große Affinität zu Wasser, dass es bei der Kristallisation aus fast allen Lösungsmitteln als Hemihydrat anfällt (Kuhnert-Brandstätter & Winkler 1976). Es liegt bei der Kristallisation aus wässriger Lösung, aber auch aus Ethylacetat, Chloroform, absolutem Ethanol und

anderen wasserfreien Lösungsmitteln als Hemihydrat vor (Variankaval et al. 2000). Die Kristallstruktur des Hemihydrats besteht dabei aus einer Assoziation von A- und D-Ring (Kopf-Schwanz-Bindung), die über Wasserstoffbrückenbindungen des Wassermoleküls vermittelt wird (Abb. 6.3). Das Wasser ist entscheidend für die Kristallstabilität.

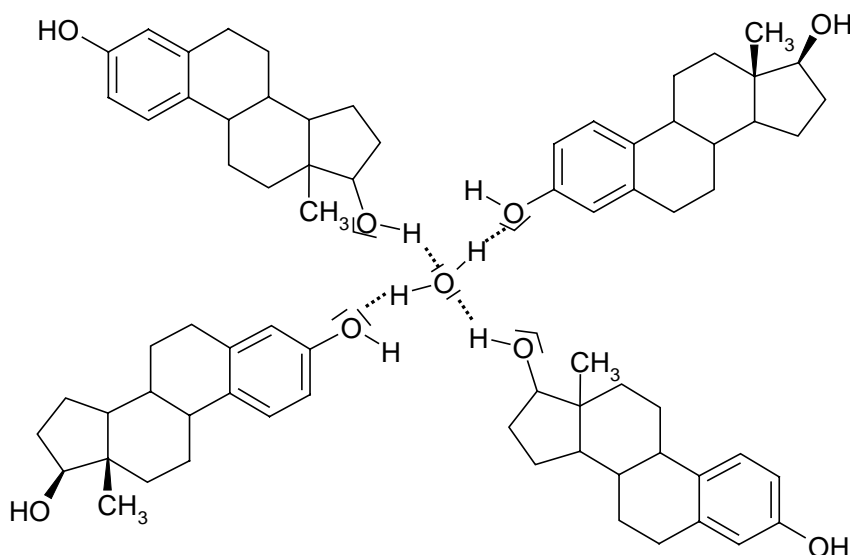


Abb. 6.3. Strukturmodell von E2-hemihydrat (Variankaval et al. 1999).

Beim Erhitzen des E2-hemihydrats in der DSC setzt die Wasserabgabe aus dem Kristallgitter bei 100°C ein und erreicht ihren ersten Höhepunkt bei etwa 130°C. Bei 171 bis 174°C, knapp unterhalb des Schmelzbereichs der stabilen Modifikation I, tritt jedoch noch ein deutlicher Peak auf, der dem plötzlichen Freiwerden von Wasser beim Schmelzen entspricht (Kuhnert-Brandstätter & Winkler 1976, Variankaval et al. 2000).

### 6.1.1.3 Pulverröntgenbeugung und Kristallgitter

Das kristalline, mikronisierte E2-hemihydrat ergibt ein charakteristisches Reflexmuster (Abb. 6.4). Für E2-hemihydrat ist eine orthorhombische Elementarzelle mit einer Koordinationszahl von vier beschrieben (Tab. 6.3) (Busetta & Hospital 1972). Die Anordnung der Moleküle innerhalb der Elementarzelle ist in Abb. 6.5 wiedergegeben.

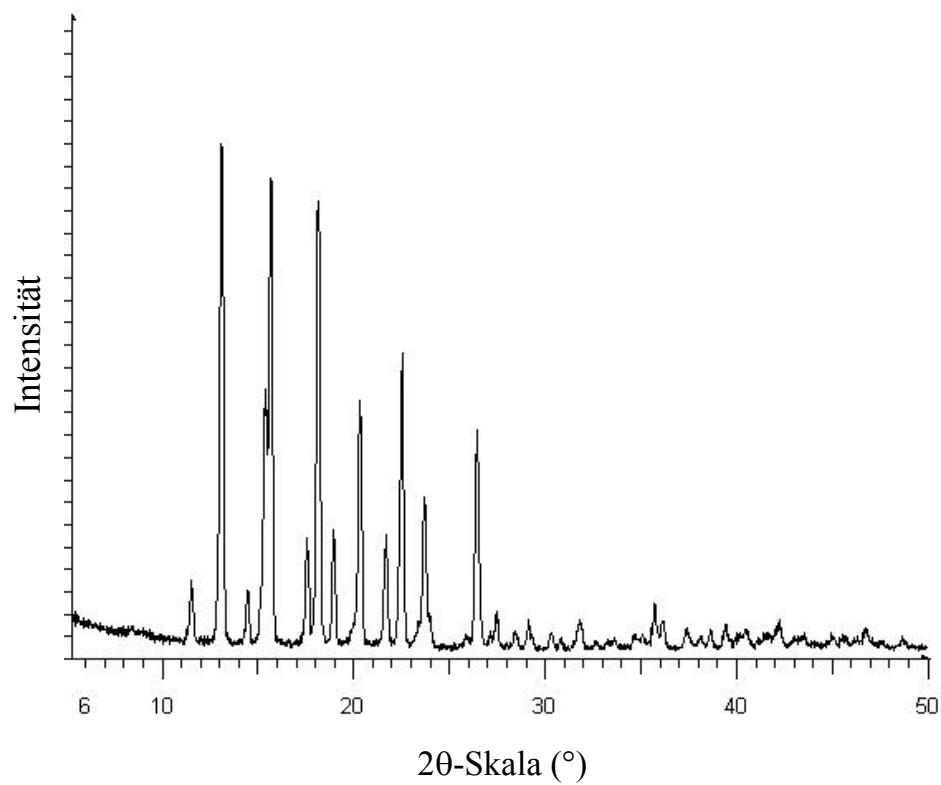


Abb. 6.4. Pulverröntgendiagramm von E2-hemihydrat.

a (Å):	12,055	b (Å):	19,280	c (Å):	6,630
$\alpha$ (°):	90	$\beta$ (°):	90	$\gamma$ (°):	90
Kristallgitter	orthorhombisch				
Zellvolumen (Å <sup>3</sup> )	1540,9				
Z	4				
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2				

Tab. 6.3. Kristalldaten der Elementarzelle für E2-hemihydrat (nach Busetta & Hospital 1972).

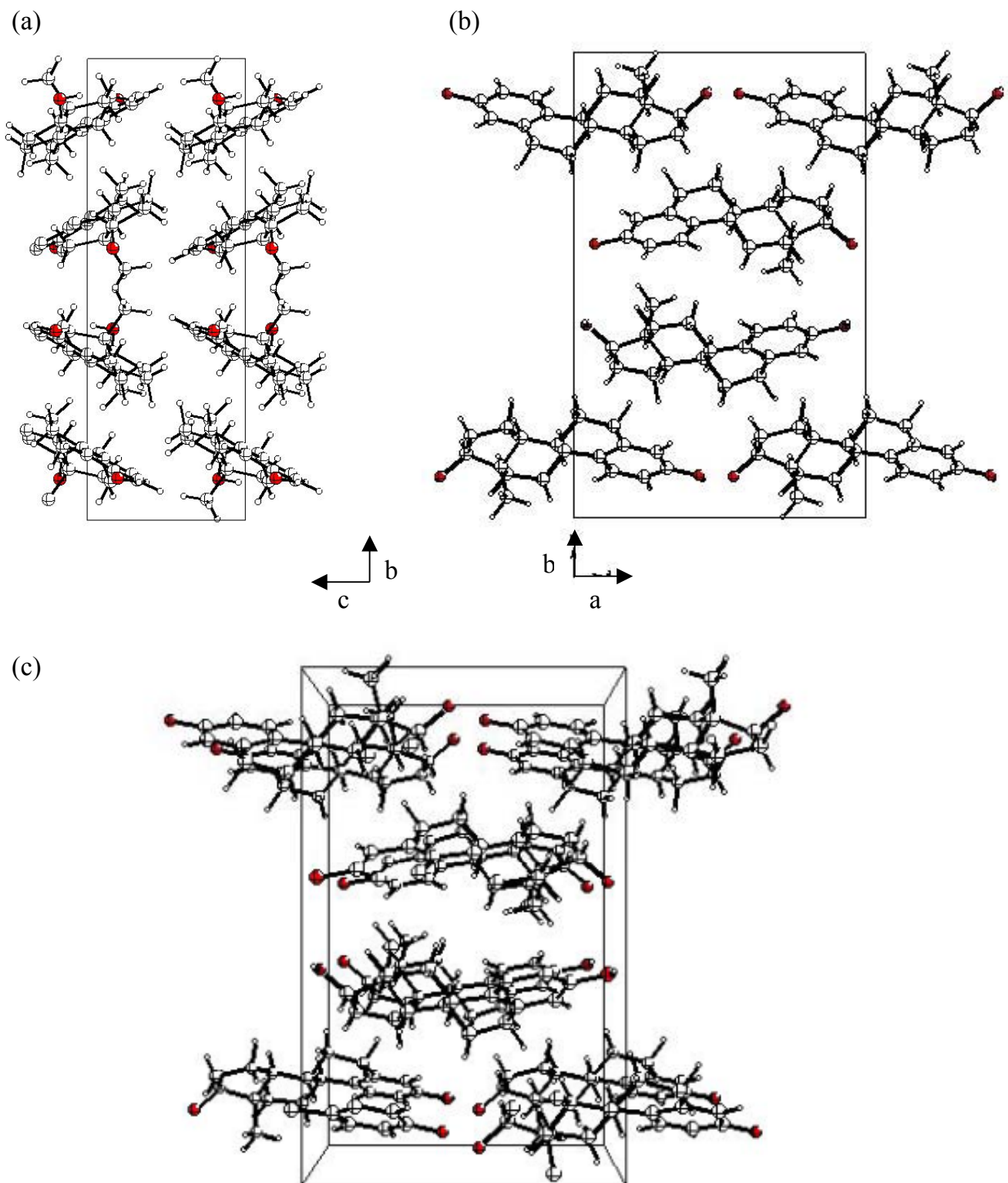


Abb. 6.5. Anordnung von E2-hemihydrat in der Elementarzelle (nach Busetta & Hospital 1972) in Parallelprojektion entlang der a-Achse (a) und entlang der c-Achse (b) sowie in Zentralprojektion entlang der c-Achse (c).



## 6.1.2 Norethisteronacetat (NEA)

### 6.1.2.1 Eigenschaften

Norethisteronacetat, im Folgenden NEA genannt, ist ein weißes kristallines Pulver, das praktisch unlöslich in Wasser, aber löslich in Ethanol (1:10) und Ether (1:18) sowie gut löslich in Chloroform (1: <1) ist. Die Wasserlöslichkeit von NEA bei 25°C beträgt etwa 6 µg/ml (Higuchi et al. 1979). Die Schmelztemperatur liegt zwischen 162 und 165°C und die molare Masse beträgt 340,46 g/mol (Abb. 6.6).

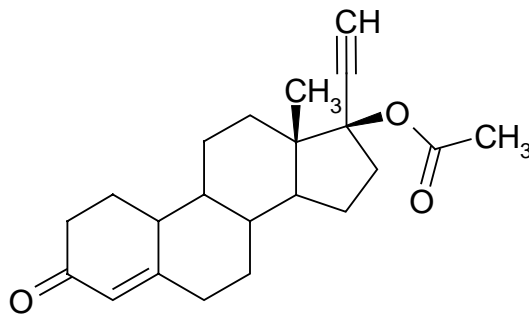


Abb. 6.6. Strukturformel des Norethisteronacetats (Summenformel:  $C_{22}H_{28}O_3$ ).

Bei Norethisteronacetat handelt es sich um ein Gestagen mit schwach estrogener Aktivität, das vor allem zusätzlich zur Substitutionstherapie mit Estrogenen bei Beschwerden der Wechseljahre und zur Verzögerung einer durch Estrogenmangel bedingten Osteoporose eingesetzt wird. Aber auch in der hormonellen Kontrazeption, bei Zyklusstörungen, Dysmenorrhoe (Menstruationsbeschwerden, Endometriose) und prämenstruellem Symptom findet NEA Anwendung. Die Tagesdosis liegt bei 1 bis 5 mg.

Als Nebenwirkungen können Müdigkeit, Übelkeit, Veränderungen der Leberfunktionswerte und Gynäkomastie auftreten. Eine Vergiftung äußert sich in Tremor, gastrointestinalen Probleme, Erbrechen und Wasserretention.

### 6.1.2.2 Pulverröntgenbeugung und Kristallgitter

Das kristalline Norethisteronacetat führt zu einem von E2-hemihydrat verschiedenen, aber charakteristischen Reflexmuster (Abb. 6.7). Nach Steiner (1996) ergibt sich ebenfalls eine orthorhombische Elementarzelle mit der Koordinationszahl vier (Tab. 6.4). Die Elementarzelle ist geringfügig größer als die des E2-hemihydrat, was aus der größeren Molekülstruktur durch die sperrigeren Substituenten erklärt werden kann.

Die Anordnung der Moleküle in der Elementarzelle ist im Vergleich zum E2-hemihydrat verändert (Abb. 6.8). Die NEA-Moleküle sind über A-Ring-A-Ring- oder D-Ring-D-Ring-Bindung verknüpft.

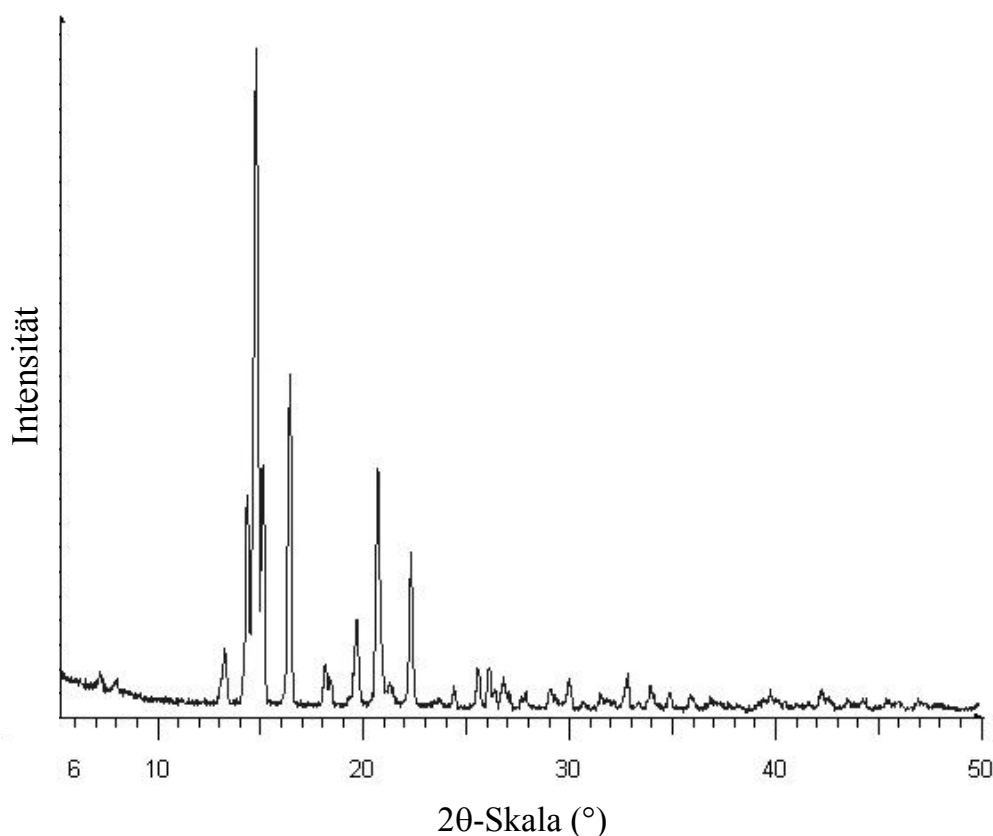


Abb. 6.7. Pulverröntgendiagramm von Norethisteronacetat (NEA).

a (Å):	6,830	b (Å):	12,164	c (Å):	23,846
$\alpha$ (°):	90	$\beta$ (°):	90	$\gamma$ (°):	90
Kristallgitter	orthorhombisch				
Zellvolumen (Å <sup>3</sup> )	1981,2				
Z	4				
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>				

Tab. 6.4. Kristalldaten der Elementarzelle für Norethisteronacetat (nach Steiner 1996).

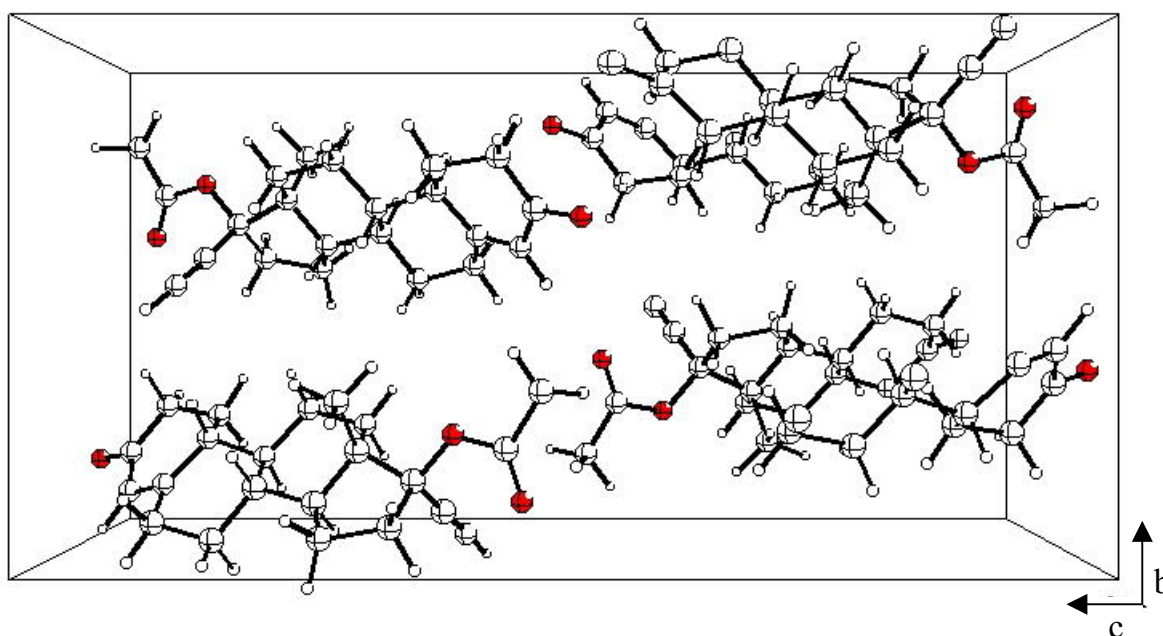


Abb. 6.8. Ausschnitt der Anordnung von NEA in der Elementarzelle in Zentralprojektion entlang der a-Achse (nach Steiner 1996).



## 6.2 Herstellung der TTS

Um die Kristallisation in transdermalen Matrixsystemen zu untersuchen, wurden TTS-Lamine mit den Steroidhormonen E2-hemihydrat sowie NEA hergestellt. Diese neigen oberhalb der Sättigungskonzentration zur Kristallisation. Die Kristalle werden bei den meisten Systemen schon nach einigen Tagen mit bloßem Auge als weiße Stellen in den durchsichtigen Filmen sichtbar.

### 6.2.1 Auswahl des Matrixpolymers

Verschiedene Polymere wurden für die Einarbeitung der beiden Hormone untersucht:

- Kraton D1107 (Isopren-Styrol-Coblockpolymer) und Foral 85E im Verhältnis 1:3
- Oppanol<sup>®</sup> B10 und B100 (Polyisobutylen) im Verhältnis 3:1
- Silikonkleber
- Durotak<sup>®</sup> 387-2287

In die Lamine auf der Grundlage von Foral/Kraton, Oppanolen<sup>®</sup> sowie Silikonkleber wurden je 0,75 % E2-hemihydrat und 0,75 % NEA eingearbeitet. Schon einen Tag nach der Herstellung konnten mikroskopisch Kristalle identifiziert werden, die sich in ihrer Größe und Anzahl während der weiteren Lagerung nicht veränderten. Wegen der sehr geringen Löslichkeit der ausgewählten Wirkstoffe wurde von diesen Polymeren Abstand genommen. Durotak<sup>®</sup> 387-2287, ein Polyacrylat-Vinylacetat-Polymer, bewies dagegen eine gute Aufnahmefähigkeit für die Hormone. Arzneistoffkonzentrationen von bis zu 10 % ergaben nach dem Trocknen klare Filme, die nach einigen Tagen kristallisierten. Dabei war ein deutliches Kristallwachstum über Wochen bis Monate sichtbar.

## 6.2.2 Herstellung der TTS-Lamine

### 6.2.2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Estradiol-hemihydrat, mikronisiert	Lohmann Therapie-Systeme, Andernach
Norethisteronacetat (NEA)	Lohmann Therapie-Systeme, Andernach
Polyethylenglycol 400 (PEG 400)	Lohmann Therapie-Systeme, Andernach
Polyethylenglycol 900 (PEG 900)	Fluka Chemie GmbH, Buchs (Schweiz)
Eutanol G (2-Octyldodecanol)	Lohmann Therapie-Systeme, Andernach
Glycerol	P.F.V. GmbH, Burgbernheim
C Mannidex <sup>®</sup> 16 700 (Mannitol)	Cerestar, Krefeld
Ethylacetat	Merck Eurolab, Darmstadt
Ethanol	Merck Eurolab, Darmstadt
Durotak <sup>®</sup> 387-2287	National Starch, Zutphen (Niederlande)
Hostaphan RN 100	Mitsubishi Polyester Film GmbH, Wiesbaden
Hostaphan RN 23	Mitsubishi Polyester Film GmbH, Wiesbaden
Cotran 9728	3M Drug Delivery Systems, Borken
Rakel 450-600 µm	Erichsen, Hemer-Sundwig/Weste
Analysenwaage Toledo AB 204	Mettler Toledo, Nänikon (Schweiz)
Präzisionswaage PT 600	Sartorius, Gießen
IKA-Rührgerät LFA 400 mit Flügelrührer	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Trockenschrank	Ehret, Tulln (Österreich)

Bei dem Polymer Durotak<sup>®</sup> 387-2287 handelt es sich um ein Polyacrylat-vinylacetat mit Hydroxyl-Funktionen, welches 50- bis 52%ig in Ethylacetat gelöst ist. Als Abziehfolie wurde für die TTS-Lamine Hostaphan RN 100, eine linear/quer vernetzte Folie aus Polyethylenterephthalat (PET) mit der Dicke von  $100 \pm 5 \mu\text{m}$ , eingesetzt. Diese war beidseitig silikonisiert, um sie gut von der Matrix abziehen zu können. Die Abdeckfolie Hostaphan RN 23 bestand ebenfalls aus Polyethylenterephthalat (PET), war mit  $23 \pm 1 \mu\text{m}$  allerdings wesentlich dünner und nicht silikonisiert.

Als semipermeable Membran wurde Cotran 9728, eine Ethylenvinylacetat-Membran (EVA) mit 19 % Vinylactat, verwendet. Ihre Schichtdicke betrug  $50,8 \mu\text{m}$ .

### **6.2.2.2 Herstellung der Zweischicht-Laminate**

Für die Herstellung der polymeren Matrix wurden Durotak<sup>®</sup> 387-2287 sowie PEG 400 in ein Weithalsglas eingewogen und langsam mithilfe eines IKA-Rührgerätes homogenisiert. Die Wirkstoffe E2-hemihydrat und NEA wurden in ein Becherglas eingewogen und in Ethanol dispergiert, bevor man sie quantitativ in das Weithalsglas überführte. Die Lösung wurde anschließend bei 700 bis 900 Upm für 1 ½ Stunden homogenisiert. War die Mischung zu viskos, sodass sie sich am Rührer hochzog, so wurde etwas Ethylacetat zugegeben.

Die homogenisierte Masse wurde auf einer Glasplatte auf die dickere Hostaphan RN 100-Folie mithilfe eines Rakels bei einer Spaltbreite von 550 µm ausgestrichen. Dieser Film wurde zuerst 15 min bei Raumtemperatur und anschließend 15 min im Trockenschrank bei 80°C getrocknet. Die Übersättigung der Systeme wurde demnach durch schnelle Evaporation der Lösungsmittel Ethanol und Ethylacetat während der Herstellung erreicht. Die polymere Mischung stellte ein untersättigtes System dar.

Das getrocknete Laminat wurde durch leichten Druck mit einer Gummirolle auf die dünnere Hostaphan RN 23-Folie aufgebracht. Um die doppelte Schichtdicke mit höherem Flächengewicht zu erhalten, konnte die Abziehfolie entfernt werden, um anschließend zwei Filme mittels Rolle zusammenzubringen. Ein solches doppeltes System besaß ein Flächengewicht von etwa 280 g/m<sup>2</sup>.

### **6.2.2.3 Herstellung von Mehrschicht-TTS mit semipermeabler Membran**

Zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit in der Polymermatrix wurden ein einschichtiges, wirkstoffhaltiges Laminat sowie ein einschichtiges Placebo-Laminat hergestellt. Während das Placebo auf die dünne Abdeckfolie Hostaphan RN 23 aufgezogen wurde, verblieb die wirkstoffhaltige Matrix auf der dicken Abziehfolie Hostaphan RN 100. Auf die Placebo-Schicht wurde mittels einer Gummirolle die semipermeable Membran Cotran 9728 und anschließend das wirkstoffhaltige Laminat aufgezogen. Man erhielt ein Zweischichtsystem, das durch die semipermeable Membran voneinander getrennt war.

## 6.2.3 Übersicht über die verwendeten Rezepturen

### 6.2.3.1 Wirkstoffhaltige Lamine

Versuchsreihe 1: Konstanter NEA-Gehalt von 8,7 % und steigender E2-Anteil

	VER 2A	VER 2B	VER 1	VER 2	VER 3	VER 4	VER 9
Durotak®	91,4 %	84,2 %	83,45 %	82,7 %	81,7 %	80,7 %	88,5 %
PEG 400	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %	5,0 %
E2-hemihydr.	1,5 %	-	0,75 %	1,5 %	2,5 %	3,5 %	2,5 %
NEA	-	8,7 %	8,7 %	8,7 %	8,7 %	8,7 %	4,0 %

Versuchsreihe 2: Einfluss von verschiedenen Hilfsstoffen auf die Kristallisation

	VER 0	VER 5	VER 6	VER 7	VER 8	VER 1
Durotak®	90,55 %	83,45 %	83,45 %	83,45 %	85,55 %	83,45 %
Eutanol G	-	7,1 %	-	-	-	-
Mannitol	-	-	7,1 %	-	-	-
Glycerol	-	-	-	7,1 %	-	-
PEG 400	-	-	-	-	5,0 %	7,1 %
E2-hemihydr.	0,75 %	0,75 %	0,75 %	0,75 %	0,75 %	0,75 %
NEA	8,7 %	8,7 %	8,7 %	8,7 %	8,7 %	8,7 %

Versuchsreihe 3: Estradiol-haltige TTS

	VER 2A	VER 10	VER 14	VER 11	VER 14A	VER 12	VER 13
Durotak®	91,4 %	90,9 %	89,9 %	88,9 %	87,9 %	86,9 %	84,9 %
PEG 400	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %
E2-hemihydr.	1,5 %	2,0 %	3,0 %	4,0 %	5,0 %	6,0 %	8,0 %
NEA	-	-	-	-	-	-	-

Versuchsreihe 4: NEA-haltige TTS

	VER 15	VER 16	VER 17	VER 18	VER 2B	VER 19	VER 20
Durotak <sup>®</sup>	90,9 %	88,9 %	86,9 %	84,9 %	84,2 %	82,9 %	80,9%
PEG 400	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %
E2-hemihydr.	-	-	-	-	-	-	-
NEA	2,0 %	4,0 %	6,0 %	8,0 %	8,7 %	10,0 %	12,0 %

Versuchsreihe 5: Konstantes Verhältnis E2-hemihydrat : NEA 1:3

	VER 25	VER 26	VER 27	VER 28	VER 29	VER 30	VER 31
Durotak <sup>®</sup>	90,9 %	88,9 %	86,9 %	84,9 %	82,9 %	80,9 %	78,9 %
PEG 400	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %	7,1 %
E2-hemihydr.	0,5 %	1,0 %	1,5 %	2,0 %	2,5 %	3,0 %	3,5 %
NEA	1,5 %	3,0 %	4,5 %	6,0 %	7,5 %	9,0 %	10,5 %

**6.2.3.2 Placebo-TTS**

	PLA 0	PLA 1	PLA 8	PLA 5	PLA 6	PLA 7
Durotak <sup>®</sup> 387-2287	100 %	92,9 %	95,0 %	92,9 %	92,9 %	92,9 %
PEG 400	-	7,1 %	5,0 %	-	-	-
Eutanol G	-	-	-	7,1 %	-	-
Mannitol	-	-	-	-	7,1 %	-
Glycerin	-	-	-	-	-	7,1 %

## 6.3 Flächengewicht und Gleichförmigkeit der Masse

### 6.3.1 Bestimmung des Flächengewichtes

#### 6.3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

---

Stanzeisen Ø 50 mm (Fläche: 19,907 cm <sup>2</sup> )	Lohmann Therapie-Systeme, Andernach
Folien 3M PP 2500 DIN A4 (210 x 297 mm)	3M Drug Delivery Systems, Borken
Analysenwaage Toledo AB 204	Mettler Toledo, Nänikon (Schweiz)

---

#### 6.3.1.2 Qualifizierung des Stanzeisens

A4-Folien besitzen eine genormte Fläche von 623,7 cm<sup>2</sup>. Durch Wägung von 10 Kopierfolien wurde das Flächengewicht der verwendeten Folien auf 13,93 mg/cm<sup>2</sup> bestimmt.

Aus den 10 Folien wurde jeweils eine Scheibe mithilfe des Stanzeisens ausgestanzt. Das durchschnittliche Gewicht der Stanzlinge betrug  $277,3 \pm 1,6$  mg, wodurch sich eine Fläche von 19,907 cm<sup>2</sup> für das verwendete Stanzeisen ergab.

#### 6.3.1.3 Durchführung

Das Flächengewicht der TTS-Matrix wird durch Ausstanzen der TTS-Lamine mithilfe eines Stanzeisens und anschließende Wägung bestimmt. Außer den Laminen wird ebenfalls die Abdeckfolie mit demselben Stanzeisen ausgestanzt. Entfernt man die Abziehfolie von den Laminen und nimmt die ausgestanzte Abdeckfolie als Tara, so erhält man das Gewicht der Matrix. Das Flächengewicht der hergestellten Lamine betrug  $280 \pm 20$  g/m<sup>2</sup>.

### 6.3.2 Prüfung auf Gleichförmigkeit der Masse

Für Transdermale Therapeutische Systeme ist nach Europäischem Arzneibuch die Prüfung auf Gleichförmigkeit des Gehaltes gefordert. Stellvertretend für diese Prüfung wurde die

Prüfung auf Gleichförmigkeit der Masse durchgeführt, um die Gleichmäßigkeit des Ausstrichs zu überprüfen. Dabei wurde von einer homogenen Verteilung des Arzneistoffs in der Matrix ausgegangen. Da im Arzneibuch keine höchstzulässige Abweichung von der Durchschnittsmasse für diese Prüfung vorgegeben ist, wurde von der geringsten zulässigen maximalen Abweichung für alle Arzneiformen von 5 % ausgegangen.

Aus den Zweischicht-Laminaten des TTS VER 18/04 wurden 10 Proben ausgestanzt und gewogen. Die maximal gemessene Abweichung von der Durchschnittsmasse betrug 3,5 % und lag damit unter der gestellten Anforderung (Tab. 6.5). Es ist von einer sehr gleichmäßigen Schichtdicke der TTS-Lamine auszugehen.

Proben-Nr.	Matrixgewicht (mg)	Abweichung (%)
1	528,8	-0,25
2	538,5	1,58
3	539,5	1,77
4	536,6	1,23
5	511,6	-3,49
6	523,4	-1,26
7	526,4	-0,70
8	529,8	-0,06
9	545,0	2,81
10	521,2	-1,68
Durchschnitt	530,1 mg	
maximale positive Abweichung	2,8 %	
maximale negative Abweichung	-3,5 %	
Flächengewicht (g/m <sup>2</sup> )	266,3 g/m <sup>2</sup>	

Tab. 6.5. Prüfung des TTS VER 18/04 auf Gleichförmigkeit der Masse.

## 6.4 Polarisationsmikroskopie

### 6.4.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

---

Objektträger 76 x 26 mm	Merck Eurolab, Darmstadt
Standard-Mikroskop mit Analysator	Carl Zeiss, Oberkochen
Hilfsobjekt Quarz Rot I	Carl Zeiss, Oberkochen
Fotoapparat XD5 mit Mikroskopaufsatz	Minolta, Langenhagen
Kodak Diafilme E100S	Kodak GmbH, Stuttgart

---

### 6.4.2 Technische Daten

---

Mikroskop	Standard-Mikroskop mit Polarisator und Analysator
Vergrößerung des Mikroskopes	80-fach
Objektiv	10 / 0.22
Okular	8-fach
Hilfsobjekt	Quarz Rot I

---

### 6.4.3 Durchführung

Die Polarisationsmikroskopie stellt eine Methode dar, um das Kristallisationsverhalten von E2-hemihydrat und NEA nachzuweisen. Die hergestellten Lamine werden bei Raumtemperatur gelagert und in definierten Abständen polarisationsmikroskopisch auf ihr Kristallwachstum untersucht. Dazu werden aus den TTS-Laminaten Proben ausgeschnitten und nach Entfernung der Abziehfolie auf einen Objektträger aufgebracht.

Nach 15-minütigem Einfrieren im Tiefkühlschrank lässt sich die Abdeckfolie ruckartig abziehen, sodass man den reinen Polymermatrix-Film erhält, der sich mikroskopisch untersuchen lässt. Die verwendete Hostaphan-Abdeckfolie ist kristallin und würde die mikroskopische Untersuchung stören.



## 6.5 Mikrokalorimetrie

Für die mikrokalorimetrischen Untersuchungen wurde das isotherme Wärmeleitungs-mikrokalorimeter Thermal Activity Monitor 2277 (TAM 2277) der Firma Thermometric AB (Järfalla, Schweden) eingesetzt, bei dem die Prozesse unter stark isothermen Bedingungen ablaufen. Die Wärme aus physikalischen und chemischen Vorgängen kann mit sehr hoher Empfindlichkeit detektiert werden, denn die erfassbaren Temperaturdifferenzen liegen im Bereich von  $10^{-6}$  °C. Damit sind bereits Wärmeströme im  $\mu$ W-Bereich messbar. Solche Kalorimeter, die sehr empfindlich sind, werden für gewöhnlich als Mikrokalorimeter bezeichnet. Verglichen mit herkömmlichen Differential Scanning Calorimetry (DSC)-Geräten ist die Empfindlichkeit des Mikrokalorimeters etwa 10000-fach höher. Dieser Empfindlichkeitsvorteil ergibt sich durch die 100-fach größere Probenmasse und die ebenfalls 100-fach höhere Messempfindlichkeit gegenüber der DSC (Beezer et al. 1999).

### 6.5.1 Aufbau des TAM 2277

Die Fähigkeit, sehr kleine Wärmeströme zu messen, beruht auf der Temperaturstabilität des geschlossenen, thermostatisierten Wasserbads mit 25 Litern Fassungsvermögen (Abb. 6.9). Die Temperatur ist zwischen 20 und 80°C auf  $\pm 0,0002$ °C über 8 Stunden genau, vorausgesetzt die Raumtemperatur bleibt über diese Zeit mit  $\pm 1$ °C konstant.

Das Wasser wird durch eine Pumpe mit einer Flussrate von 30 l/min ständig umgewälzt und die Temperatur über Thermistoren kontrolliert. Ein Strom, der der Abweichung der Isttemperatur von der Solltemperatur proportional ist, wird an einen Feinheizer im Pumpensystem weitergegeben. Ein zusätzlich vorhandener Vorheizer arbeitet nur, wenn der Feinheizer mit mehr als 40 % Kapazität arbeitet. Vor- und Feinheizer sollen kontinuierlich laufen, weshalb das System von einem externen Umlaufthermostaten mit einem gleichmäßigen Kühleffekt belastet wird. Die hohe Temperaturkonstanz wird also durch den permanenten Kühleffekt verbunden mit der ständig auf minimaler Leistung arbeitenden Heizung im inneren Wasserbad erreicht.

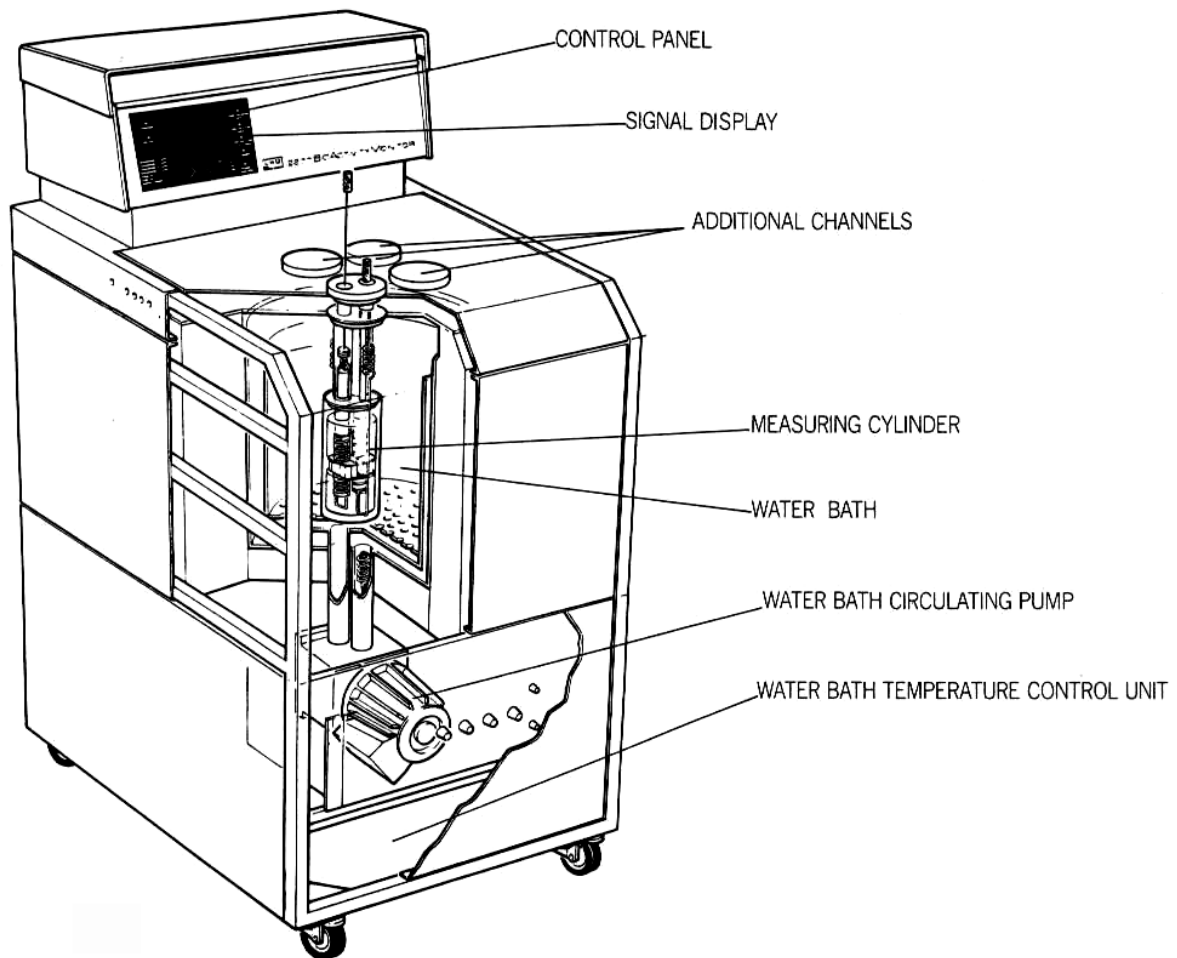


Abb. 6.9. „Aufgeschnittene“ Ansicht des TAM 2277 (Informationsmaterial von Thermometric AB).

Das Mikrokolorimeter TAM enthält im Wasserbad vier unabhängige Messzylinder (Abb. 6.10a), wobei jeder Messzylinder zwei Messgänge mit einem inneren Durchmesser von 14 mm für Probe und Referenz besitzt. Die Methode arbeitet nach dem Zwillingsprinzip, denn die Messgänge sind gegeneinander geschaltet und ergeben ein Differenzsignal.

Als Probenbehälter können entweder 3 ml-Glasvials oder 5 ml-Edelstahlampullen verwendet werden. Diese werden mit einem bekannten Probengewicht befüllt und mit Dichtscheiben verschlossen. Vor dem Einbringen der Ampullen in die Messposition müssen die Probenbehälter auf die Versuchstemperatur gebracht werden. Dazu werden sie etwa zur Hälfte in die Messzylinder abgesenkt. In dieser Equilibrierposition besteht guter thermischer Kontakt zum Wasserbad. Die Equilibrierzeit ist von verschiedenen Faktoren, wie z.B. der

Wärmekapazität und Wärmeleitfähigkeit der Probe sowie der Differenz zwischen Proben- und Messtemperatur, abhängig. Eine Edelstahllampulle, die mit 5 ml Wasser gefüllt war und eine Temperatur von 25°C besaß, benötigte 45 min, um den Gleichgewichtszustand bei höchster Empfindlichkeit ( $< 0,1 \mu\text{W}$ ) zu erreichen, wenn die Messtemperatur 37°C betrug (Suurkuusk & Wadsö 1982).

Nach der Equilibrierung können die Ampullen in die Messposition abgelassen werden. Das Absenken muss langsam erfolgen, weil es sonst zu Wärmeturbulenzen durch Reibungseffekte in den Messzylindern kommen kann, die den Beginn der Messung stark beeinflussen. In den ersten 30 bis 60 Minuten der Messung erscheinen Wärmeflussignale, die auf Reibungswärme beim Ablassen der Proben in die Messposition zurückzuführen sind. Die theoretische Erfassungsgrenze des TAM 2277 liegt bei  $0,1 \mu\text{W}$  und die Messgenauigkeit beträgt bei einem Messbereich von 3 bis  $3000 \mu\text{W} \pm 0,2 \mu\text{W}$ .

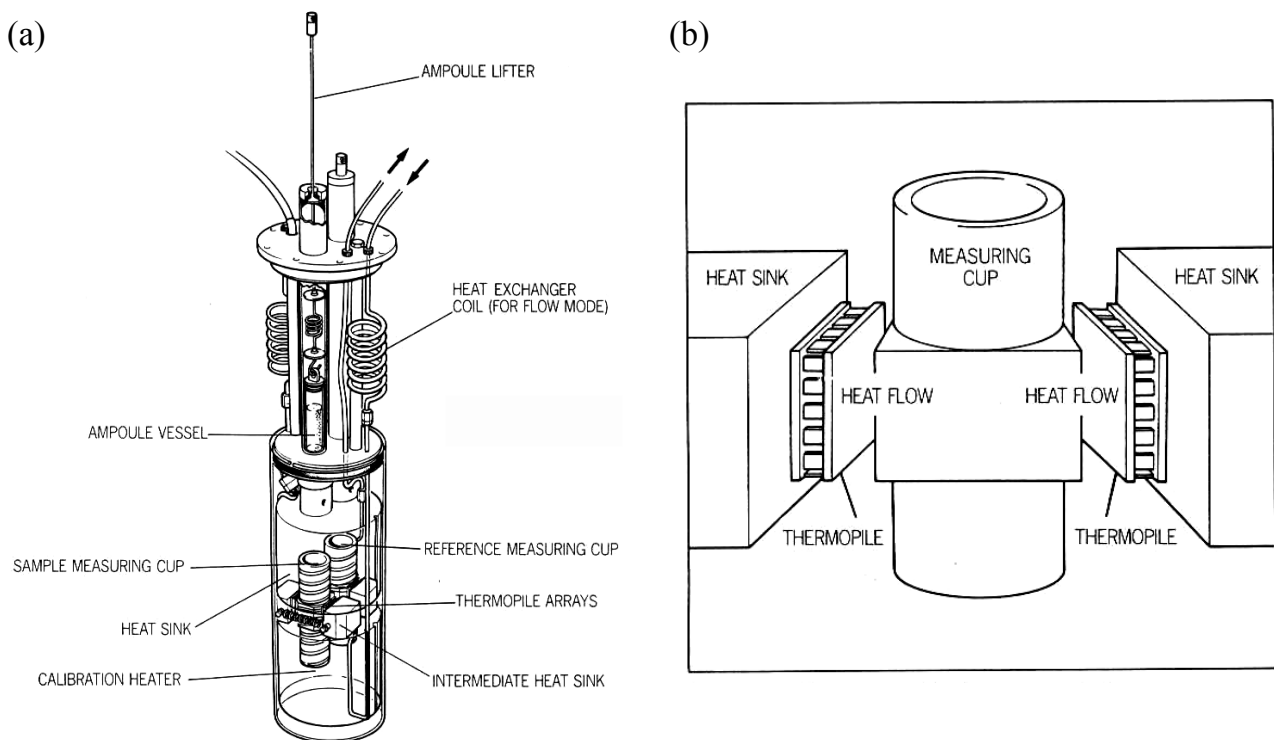


Abb. 6.10. (a) Innenansicht des Messzylinders des TAM 2277 und (b) Messprinzip der Messzelle.

## 6.5.2 Messprinzip des TAM

Jede kalorimetrische Messeinheit besteht aus einer Messzelle zwischen zwei Thermosäulen (Abb. 6.10b). Die in den Probengefäßen entstehende Wärme wird über die Thermoelemente an den umgebenden großen Metallblock (Heat sink) abgegeben, der in gutem thermischen Kontakt zum isothermen Wasserbad steht und die Wärme quantitativ an das Wasserbad ableitet. Der gesamte Metallblock besteht aus zwei zylindrischen und vier kleinen kubischen Aluminiumblöcken (Suurkuusk & Wadsö 1982).

Die Thermosäulen bestehen aus je 72 halbleitenden Thermoelementen in Reihenschaltung, die eine Temperaturdifferenz in eine Thermospannung umwandeln. Da die Temperaturdifferenz direkt proportional zum Wärmefluss ist, ist die gemessene Spannung auch direkt proportional zum Wärmefluss der Probe und wird als Wärmefluss  $dQ/dt$  in  $\mu W$  gegen die Zeit dargestellt. Das Zeitintegral der Kurve ergibt die Gesamtwärmemenge  $Q$  in Joule.

## 6.5.3 Basislinienstabilität

### 6.5.3.1 Leere Messkanäle

Vor der Bestimmung der Basislinienstabilität wird zunächst ein Abgleich der Basislinie auf Null durchgeführt. Die Basislinienstabilität der leeren Messzylinder betrug bei  $25^{\circ}C \pm 0,05 \mu W$  über 44 Stunden. Nur der Messkanal 1 zeigte mit  $\pm 0,15 \mu W$  stärkere Schwankungen. Deshalb wurden zur Messung ausschließlich die Kanäle 2 bis 4 eingesetzt.

### 6.5.3.2 Leere Edelstahllampullen

Um bei den Messungen vergleichen zu können, ob es sich bei den erhaltenen Signalen um Effekte der Probe oder um Spannungseffekte der Edelstahllampullen handelt, wurde die Basislinie von leeren Edelstahllampullen bei  $25^{\circ}C$  bestimmt. Die erste Stunde nach Absenken der Edelstahllampullen in die Messposition ist durch Reibungseffekte beeinflusst. Eine konstante Basislinie der leeren Edelstahllampullen stellte sich erst eine Stunde nach

Absenken der Ampullen ein. Dabei ist die Basislinie ebenfalls auf  $\pm 0,05 \mu\text{W}$  über 44 Stunden konstant. Die Basislinie ist also genauso stabil wie die der leeren Messkanäle.

### 6.5.3.3 Signal-Rauschen der Basislinie

Das Signal-Rauschen der Basislinie bei leeren Messzylindern beträgt ungefähr  $0,1 \mu\text{W}$ .

Messkanal 4 zeigte besonders bei höherer Kalorimetertemperatur ein stärkeres Basislinienrauschen, da hier eine Durchflusszelle angeschlossen werden kann. Die eingebauten Schläuche stehen in ständigem Kontakt mit der Umwelt, wodurch das Rauschen erklärt werden kann.

## 6.5.4 Kalibrierung

Bei der Kalibrierung kann man zwischen interner und externer Kalibrierung unterscheiden.

### 6.5.4.1 Interne Kalibrierung

Die interne Kalibrierung erfolgt elektrisch mithilfe eines permanenten  $50 \Omega$ -Heizwiderstandes, der sich unterhalb jeder Messposition in den Messzylindern befindet. An den Kalibrierheizwiderständen  $R$  wird eine je nach Messbereich unterschiedliche elektrische Leistung  $P$  durch Variation der angelegten Stromstärke  $I$  erzeugt (Gl. 50).

$$P = R \cdot I^2 \quad \text{Gl. 50}$$

Die Kalibrierung wird mit der leeren Messkammer durchgeführt. Als Heizleistungen können 3, 10, 30, 100, 300, 1000 und  $3000 \mu\text{W}$ <sup>3</sup> gewählt werden. Wird der Kalibrierwiderstand angestellt, beginnt der gemessene Wärmefluss anzusteigen. Mithilfe des Kalibrierwiderstandes kann eine statische und eine dynamische Kalibrierung durchgeführt werden.

---

<sup>3</sup> Die exakten Heizleistungen betragen 2.8, 9.9, 29.4, 99.7, 299.6, 997.2 und 2997.4  $\mu\text{W}$ .

#### 6.5.4.1.1 Statische Kalibrierung

Bei der statischen Kalibrierung wird der Kalibrierheizwiderstand mit der vollen Leistung belastet. Der Wärmefluss steigt bis zu einem konstanten Plateau an (Abb. 6.11). Das Wärmeflussplateau muss dem gewählten Messbereich entsprechen bzw. wird auf diesen eingestellt.

Das Wärmeflussignal erreicht nur langsam das Steady state. Für die leeren Messzylinder beträgt die Halbwertszeit bis zum Erreichen des vollen Messsignals 73 Sekunden. Die Kurve hinkt dem erzeugten Wärmefluss hinterher, sodass die statische Kalibrierung demnach nur für langsame Reaktionen sinnvoll ist.

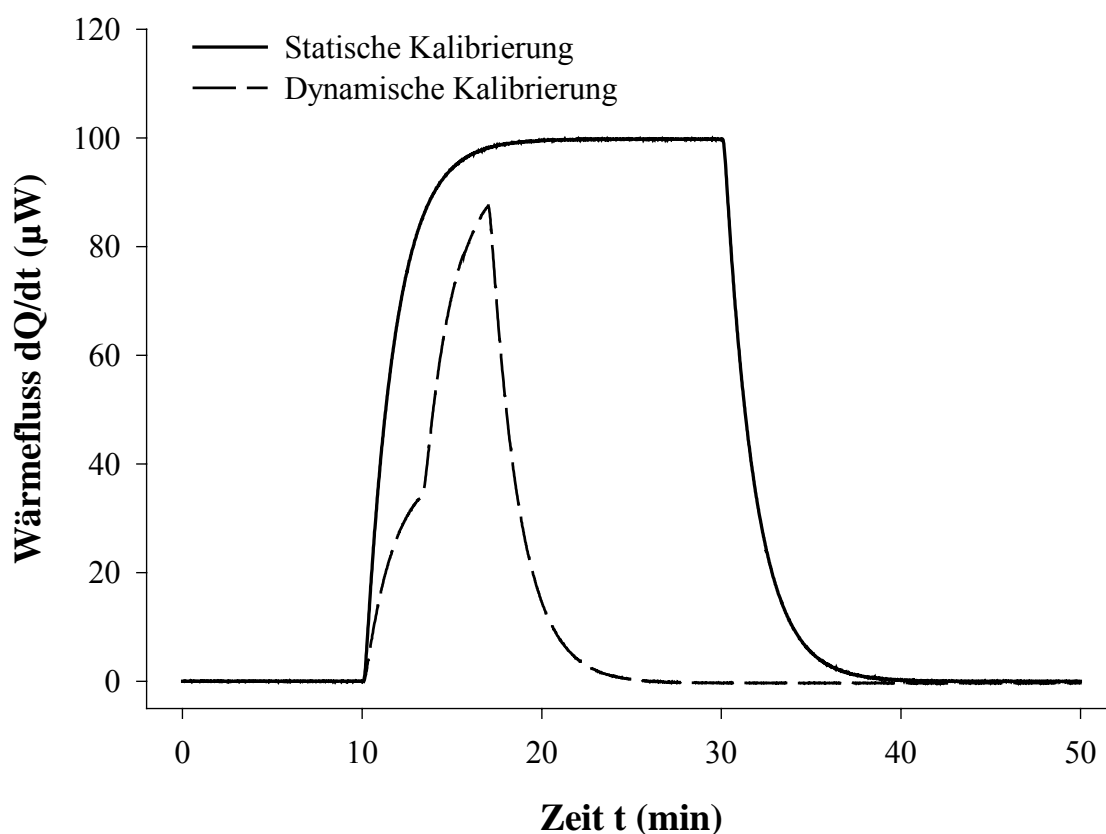


Abb. 6.11. Statische und dynamische Kalibrierung im Messbereich 100  $\mu W$  bei 25°C.

#### 6.5.4.1.2 Dynamische Kalibrierung

Handelt es sich bei der mikrokalorimetrisch untersuchten Reaktionen um schnell ablaufende Prozesse, so führt die statische Kalibrierung zu einer signifikanten Verzerrung der

Wärmeﬂuss-Zeit-Kurve relativ zur wahren kinetischen Kurve. Um trotzdem genaue kinetische Informationen aus der gemessenen Wärmeﬂuss-Zeit-Kurve zu erhalten, sollte für schnelle Reaktionen eine dynamische Kalibrierung durchgeführt werden, mit deren Hilfe das Messsignal korrigiert werden kann (Suurkuusk & Wadsö 1982).

Bei der dynamischen Kalibrierung handelt es sich nicht um eine Endwertkalibrierung. Die Heizwiderstände werden zuerst mit 40 % der ausgewählten Leistung und anschließend mit 95 % über eine festgelegte Zeitspanne beschickt (Abb. 6.11). Die Ansprechzeit des Systems wird in Form von Zeitkonstanten  $\tau$ , statischem Ausschlag und Nullabgleich gespeichert (Tab. 6.6).

Leerer Messzylinder	90 sec
Wassergefüllte Stahlpulle	300 sec

Tab. 6.6. Übersicht über die Zeitkonstanten  $\tau$  des TAM 2277-201 mit einfachem Zylinder.

#### 6.5.4.2 Externe Kalibrierung

Nach der internen Kalibrierung ist keine Absolutmessung von Wärmemengen möglich, da das Signal nicht genau dort erzeugt wird, wo die Messbehälter positioniert sind, sondern etwas darunter. Will man absolute Werte messen, so sollte eine externe Kalibrierung anhand einer chemischen Reaktion mit bekannter Wärmetönung durchgeführt werden.

Die Hydrolyse von Triacetin in einem Imidazol-Acetat-Puffer bei 25°C eignet sich sehr gut für die chemische Kalibrierung des Mikrokalorimeters (Experimental & Technical Note EN 10). Diese Reaktion wurde von Chen und Wadsö im Jahre 1982 entwickelt.

#### 6.5.4.3 Durchführung der Kalibrierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde vor den Messungen eine statische Kalibrierung im Messbereich 100  $\mu$ W durchgeführt. Dazu wurde zuerst die Nulllinie justiert, anschließend an den Kalibrierheizwiderstand eine konstante Heizleistung angelegt und bei Erreichen des Plateaus der Kalibrierwärmeﬂuss nachjustiert.

#### 6.5.4.3.1 Kalibrierpräzision

Um die Kalibrierpräzision bei 25°C zu ermitteln, wurde nach einmaliger Kalibrierung bei 99,7  $\mu\text{W}$  der Kalibrierwiderstand mit der entsprechenden konstanten Heizleistung zehnmal erneut eingeschaltet und das Wärmeflussplateau ausgewertet. Der gemessene Wärmefluss betrug  $99,64 \pm 0,02 \mu\text{W}$ , was einer durchschnittlichen Schwankung von 0,02 % zwischen den einzelnen Kalibrierungen entspricht. Die Kalibrierung war demnach sehr gut reproduzierbar.

#### 6.5.4.3.2 Kalibrierung nach mehreren Versuchen

Nach mehreren Messungen über 7 Tage wurde der Kalibrierheizwiderstand erneut mit der entsprechenden Heizleistung belastet, um zu überprüfen, ob die Kalibrierung über die Versuchsreihe hinweg erhalten geblieben ist. Bei einem Heizwiderstand von 99,7  $\mu\text{W}$  stellte sich ein durchschnittlicher Kalibrierwert von  $99,74 \pm 0,07 \mu\text{W}$  ein. Aus diesem Wert kann man schlussfolgern, dass die Kalibrierung über die Versuchsreihe hinweg erhalten geblieben ist. Eine erneute Kalibrierung ist nur nach Änderung der Messtemperatur, Änderung des Messbereichs oder nach Stromausfall notwendig.

#### 6.5.4.3.3 Ermittlung der elektrischen Kalibrierlinearität im Messbereich 100 $\mu\text{W}$

Zur Bestimmung der Messgenauigkeit innerhalb eines Messbereichs wurde die Kalibrierlinearität bei 25°C bestimmt. Nach einer einmaligen Kalibrierung bei 100  $\mu\text{W}$  wurden alle in diesem Bereich möglichen Heizleistungen des Kalibrierwiderstandes (3, 10, 30 und 100  $\mu\text{W}$ ) hintereinander ein- und ausgeschaltet. Die angelegten Leistungen  $P$  wurden mit dem gemessenen Wärmefluss  $dQ/dt$  verglichen und der prozentuale Messfehler berechnet.

Die gemessenen Wärmeflüsse sind von der angelegten Heizleistung  $P$  linear abhängig (Abb. 6.12). Tab. 6.7 und Abb. 6.13 zeigen den prozentualen Messfehler in Abhängigkeit von der angelegten Heizleistung nach Kalibrierung bei 100  $\mu\text{W}$ . Über den gesamten Messbereich wich der Messwert um weniger als 2 % vom theoretischen Heizwert ab. Aus dem



prozentualen Messfehler konnte eine hinreichende Messgenauigkeit mit einem Fehler  $\leq 0,5 \%$  im Bereich zwischen 30 und 100  $\mu\text{W}$  ermittelt werden.

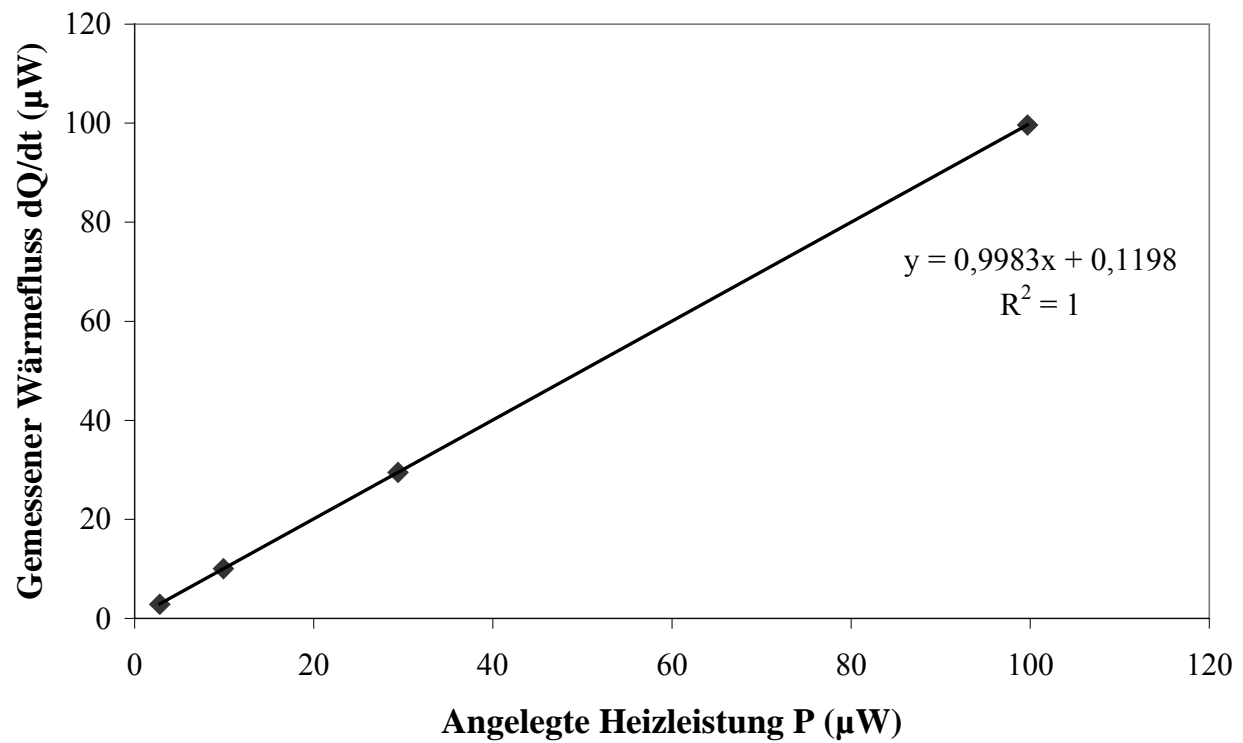


Abb. 6.12. Kalibrierlinearität im Messbereich 100  $\mu\text{W}$  bei 25°C.

Angelegte Heizleistung P (μW)	Gemessener Wärmefluss dQ/dt* (μW)	Prozentualer Messfehler [(P-dQ/dt)/P]·100
2,8	2,85	1,786 %
9,9	10,05	1,515 %
29,4	29,5	0,340 %
99,7	99,64	0,060 %

\* Mittelwert aus der Messung der vier Kanäle.

Tab. 6.7. Bestimmung der Kalibrierlinearität im Messbereich 100  $\mu\text{W}$  bei 25°C.

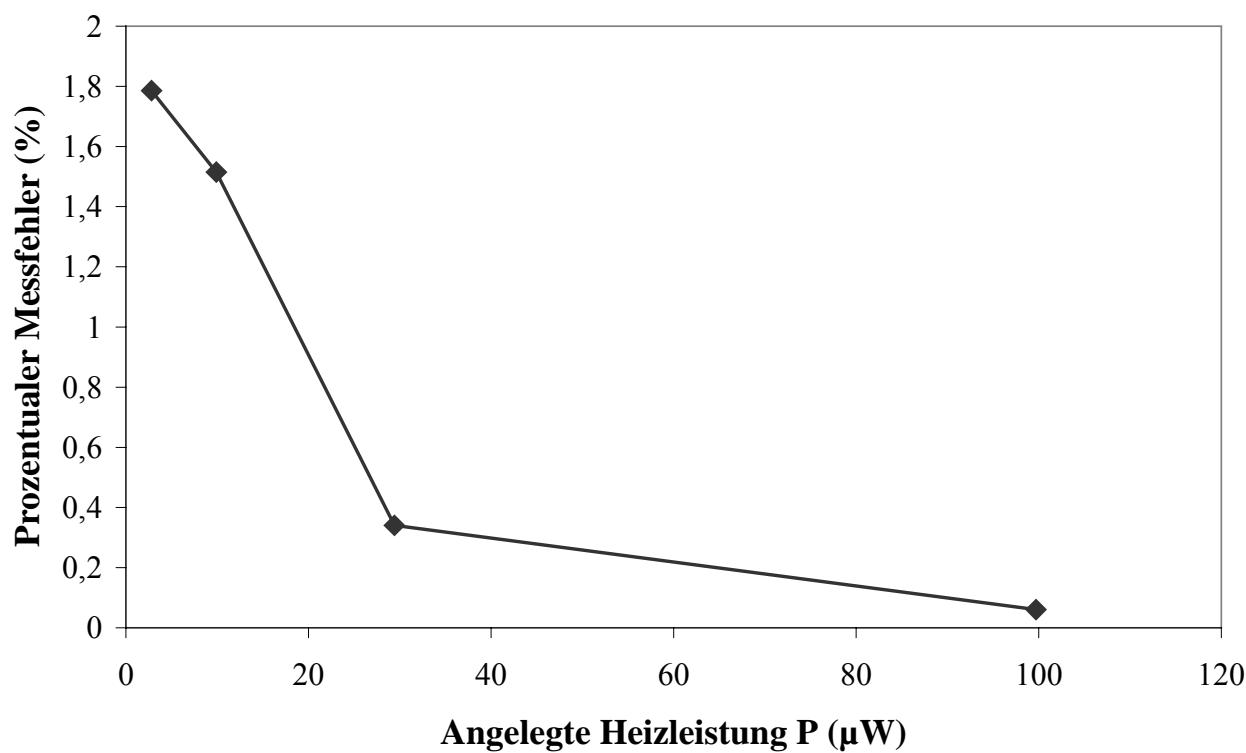


Abb. 6.13. Prozentualer Messfehler bei der Bestimmung der Kalibrierlinearität im Messbereich 100 μW bei 25°C.

6.5.5 Mikrokalorimetrische Messparameter

6.5.5.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Stanzeisen Ø 10 mm (Fläche: 0,810 cm²)	Lohmann Therapie-Systeme, Andernach
Mikrokalorimeter TAM 2277	Thermometric AB, Järfälla (Schweden)
4 ml-Edelstahlampullen	C3 Analysentechnik, Baldham
Analysenwaage Toledo AB 204	Mettler Toledo, Nänikon (Schweiz)

6.5.5.2 Messparameter

Messtemperatur	25°C
Messbereich / Kalibrierung	100 μW

Probengefäße	5 mL-Edelstahlampullen ( $\varnothing = 1 \text{ cm}$ )
Füllvolumen	maximal ( $2,4 \pm 0,1 \text{ g}$ Matrixmasse)
Probe	ausgestanzte TTS-Laminate (PLA oder VER)
Referenz	leere Edelstahlampulle
Probenzahl n	mindestens 3 Proben pro Rezeptur
Equilibrierung	45 min
Messdauer	7 Tage, Langzeituntersuchungen bis zu 5 Wochen
Software	DIGITAM 2.0
Messwerterfassung	
7-Tage-Messung	0 h bis 1 h: alle 15 sec als Durchschnitt über 10 sec 1 h bis 7 Tage: alle 2 min als Durchschnitt über 10 sec
Langzeituntersuchungen	0 bis 1 Tag: alle 2 min als Durchschnitt über 60 sec 1 bis 35 Tage: alle 15 min als Durchschnitt über 5 min

---

### 6.5.5.3 Durchführung der Messung

Die hergestellten TTS-Laminate werden direkt nach der Herstellung mit einem Stanzeisen von 10 mm Durchmesser ausgestanzt und die runden Stanzlinge zu Rollen gestapelt in die Edelstahlampullen überführt. Dabei werden die Ampullen vollständig gefüllt, um einen Luftraum über den Laminaten und damit einen Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf den Kristallisationsprozess zu vermeiden. Die Einwaage der Stanzlinge wird bestimmt. Die Proben werden sofort in das Mikrokalorimeter überführt, 45 Minuten equilibriert und über 7 Tage vermessen.

Mithilfe der Flächen- und Foliengewichte der TTS kann die pro Edelstahlampulle eingewogene Matrixmenge berechnet werden, was die Normierung der Messkurven auf die Einheit  $\mu\text{W/g}$  Matrix und damit den direkten Vergleich der Kurven ermöglicht. Die gemessenen Wärmemengen liegen also 2,4-fach höher als die dargestellten Ergebnisse, die jeweils auf 1 g polymere Matrix normiert sind.

## **6.5.6 Auswertung der Wärmeflusskurven**

### **6.5.6.1 Arzneistoff-immanenter Wärmefluss**

Arzneistoff-haltige TTS und Placebozubereitung wurden separat gegen ein leeres Referenzgefäß gemessen. Um den Arzneistoff-immanenten Wärmefluss der wirkstoffhaltigen TTS zu erfassen, wurde der Wärmefluss der Placebo-TTS von dem der wirkstoffhaltigen subtrahiert. Der resultierende Wärmefluss ist mit dem Arzneistoff assoziiert. Er beruht auf Kristallisations- oder Zersetzungsvorgängen der Arzneistoffe bzw. Interaktionen mit der Matrix. Wärmeflüsse, die durch die polymere Matrix und durch Interaktionen zwischen den Hilfsstoffen hervorgerufen werden, werden eliminiert.

### **6.5.6.2 Berechnung von initialem Wärmefluss und Wärmemenge**

Der erste Tag der mikrokolorimetrischen Messung ist durch verschiedene Effekte beeinflusst. Ausstanz- und Fülleffekte (wegen starker Haftung an den Wänden aufgewendeter Druck beim Einbringen der Stanzlinge in die Edelstahllampullen) sowie Reibungswärme beim Ablassen der Ampullen in die Messposition machen sich in einer relativ hohen Standardabweichung bemerkbar und sind nicht für den eigentlichen Kristallisationsprozess charakteristisch.

Aus diesem Grund wurden zur Auswertung der mikrokolorimetrischen Daten für das Zeitintervall 1 bis 7 Tage Kurven an die Messwerte angepasst. Aus diesen Näherungsfunktionen lassen sich der initiale maximale Wärmefluss ( $\mu\text{W/g}$ ) durch Extrapolation auf den Zeitpunkt  $t = 0$  als Schnittpunkt mit der Ordinate sowie die über die ersten 7 Tage entwickelte Wärmemenge ( $\text{J/g}$ ) durch Integration der Näherungsfunktion im Bereich 0 bis 7 Tage berechnen.

## 6.6 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Mithilfe der DSC soll versucht werden, die entstandene Kristallmenge in kristallisierten TTS anhand von Schmelzpeakflächen zu quantifizieren. Dazu wurden neben den DSC-Kurven der kristallinen Wirkstoffe E2-hemihydrat und NEA Messungen der wirkstoffhaltigen, kristallisierten Lamine aufgenommen sowie Phasenübergangstemperaturen der Placebo-Matrix bestimmt.

### 6.6.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Differential Scanning Calorimeter DSC-7	Perkin-Elmer, Rodgau
Aluminium-Pfännchen 50 µl und Deckel	Perkin-Elmer, Rodgau
Indium (Standard-Referenz-Metall)	Perkin-Elmer, Rodgau
Zink (Standard-Referenz-Metall)	Perkin-Elmer, Rodgau
Mikrowaage Sartorius supermicro	Sartorius, Göttingen

Die DSC-Messungen wurden mit der DSC-7 der Firma Perkin-Elmer durchgeführt, deren Messbereich zwischen 25°C und 730°C liegt. Zwischen einer vorwählbaren Start- und Endtemperatur werden beim kontinuierlichen Aufheizen Vorgänge innerhalb der Probe erfasst, die mit einer Wärmetönung oder einer Änderung der spezifischen Wärmekapazität einhergehen, wie z.B. Schmelzpunkte, Glasübergänge, Umwandlungen zwischen polymorphen Formen oder Kristallisationsprozesse. Endotherme Reaktionen ergeben einen positiven Peak, während exotherme Reaktionen einen negativen Peak im Diagramm zeigen. Mithilfe eines Computers ist die direkte kalorimetrische Messung und Analyse der thermischen Eigenschaften des Materials möglich.

Bei der DSC-7 handelt es sich um eine DSC-Anlage nach dem Leistungskompensationsprinzip. Die Leistungskompensations-DSC beruht auf dem Prinzip der leistungskompensierten Null-Balance, bei der Probe und Referenz immer die gleiche Temperatur besitzen. Die in der Probe absorbierte oder entwickelte Wärme wird durch Erhöhung oder Reduktion der Heizleistung ausgeglichen, sodass die Probe ebenfalls der kontinuierlichen

Temperaturerhöhung unterliegt. Eine ständige automatische Regelung der Heizleistung ist also nötig, um die Proben­temperatur immer gleich der Referenztemperatur zu halten. Das elektrische Signal orientiert sich am thermischen Verhalten der Probe.

Die Auswertung der Wärmeflusspeaks erfolgt unter Angabe der Onset-Temperaturen.

### **6.6.2 Messparameter**

---

Temperaturintervall	25-250°C
Scanningrate	10 bis 40°C/min
Kalibrierung	Zweipunktkalibrierung mit Indium und Zink
Probengefäße	Aluminiumpfännchen 50 µl
Referenz	leeres Aluminiumpfännchen
Spülgas	Stickstoff (1,4 bar)
Software	PC Series Thermal Analysis System Perkin-Elmer (1992)

---

## 6.7 Pulverröntgenbeugung

### 6.7.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

---

Guinier-Diffraktometer	Huber Diffraktionstechnik GmbH & Co KG, Rimsting
Probenhalterfolie (Haushaltsfolie)	REWE Handelsgruppe GmbH, Köln
Objektträger 76 x 26 mm	Merck Eurolab, Darmstadt

---

### 6.7.2 Messparameter und Durchführung

#### 6.7.2.1 Messparameter am Guinier-Diffraktometer

Betriebsart	Transmission	
Winkelbereich $2\theta$	7 – 30°	
Schrittweite $2\theta$	0,02°/5 sec	
Hochspannung / Röhrenstrom	40 kV / 25 mA	
Röntgenröhre	Cu-K $\alpha_1$ -Strahlung	
Monochromator	SiO <sub>2</sub>	
Wellenlänge $\lambda$	1,5406 Å = 0,15406 nm	
Detektor	Zählrohr	
Datenauswertung	EVA-Software	
Amorphe Untergrundkorrektur	Smooth (Glätten)	0,1
	Background	15,137 / 0,005

#### 6.7.2.2 Durchführung

Die TTS-Lamine wurden bei Raumtemperatur gelagert und zu definierten Zeitpunkten mithilfe der Pulverröntgenbeugung auf kristalline Anteile untersucht. Die Messung der Kristallinität erfolgte direkt nach der Herstellung der Lamine, nach 1, 2, 4, 6 und 8 Wochen sowie nach 3, 4, 6, 9 und 12 Monaten Lagerung bei Raumtemperatur.

Die Röntgenproben der TTS-Lamine wurden durch 15-minütiges Einfrieren auf einem Objektträger von ihren teilkristallinen Hostaphan-Folien abgezogen (vgl. 6.4.3) und auf die Trägerfolie mit guter Transmission für Röntgenstrahlen aufgebracht. Diese Folie war in einen Probenhalter eingespannt, der anschließend auf einem Adapter im Diffraktometer installiert wurde.

### 6.7.3 Probenhalterfolie

Alle Röntgenuntersuchungen wurden auf der Probenhalterfolie als Träger durchgeführt. Das Pulverdiagramm dieser Trägerfolie zeigt einen Reflex bei  $21,3^\circ 2\theta$ , der nicht auf die aufgetragenen Proben zurückzuführen ist (Abb. 6.14). Er tritt bei den Messungen unregelmäßig und in unterschiedlicher Höhe auf, je nachdem wie stark oder schwach die Folie auf den Probenhalter aufgezogen ist.

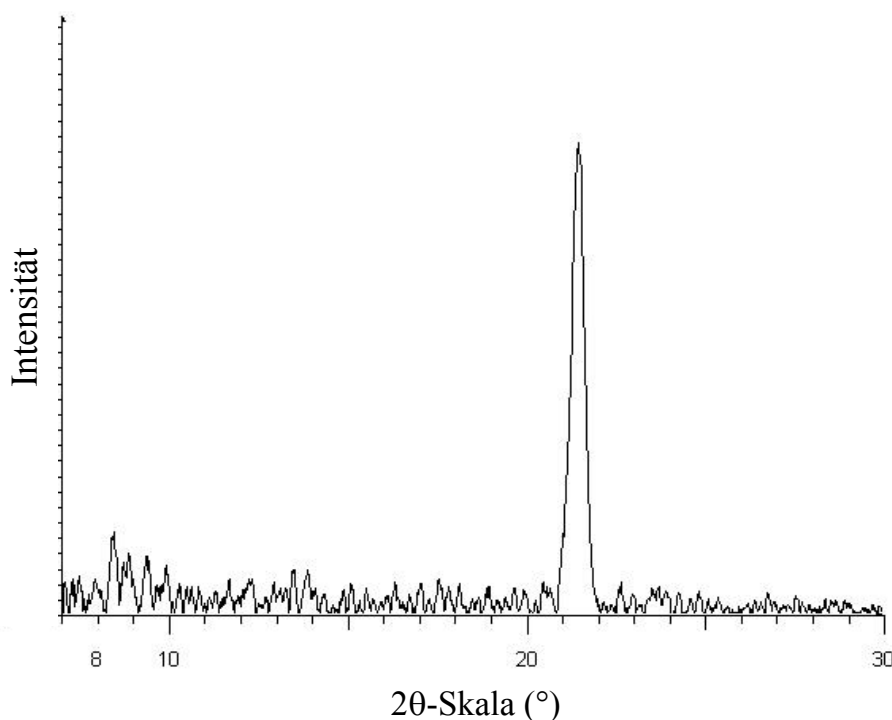


Abb. 6.14. Röntgendiagramm der Probenhalterfolie.



#### 6.7.4 Normierung der Intensität der Röntgenröhre

Die Intensität der Röntgenstrahlung nimmt während der Alterung der Röhre ab. Da das TTS PLA 1 auch während der Langzeitlagerung vollständig amorph ist und keiner Veränderung unterliegt, kann dieses zur Bestimmung eines Korrekturfaktors für die Intensität der Röntgenröhre herangezogen werden. Das TTS-Laminat einer Charge mit konstantem Flächengewicht diente über 1½ Jahre als Eichsystem. Es erfolgte ein wöchentlicher Abgleich der Untergrundintensität des TTS mit der Ursprungskurve zum Zeitpunkt  $t = 0$ , die den Maximalwert der neuen Röntgenröhre direkt nach deren Installation darstellte. Die Kurven wurden durch Multiplikation zur Deckung gebracht. Der Korrekturfaktor erhöhte sich dabei mit der Zeit, d.h. die Intensität der Röntgenröhre verringerte sich (Abb. 6.15). Der Korrekturfaktor wurde für alle Röntgenuntersuchungen angewendet, um die gemessenen Intensitäten bei der Langzeitstabilität miteinander vergleichen zu können.

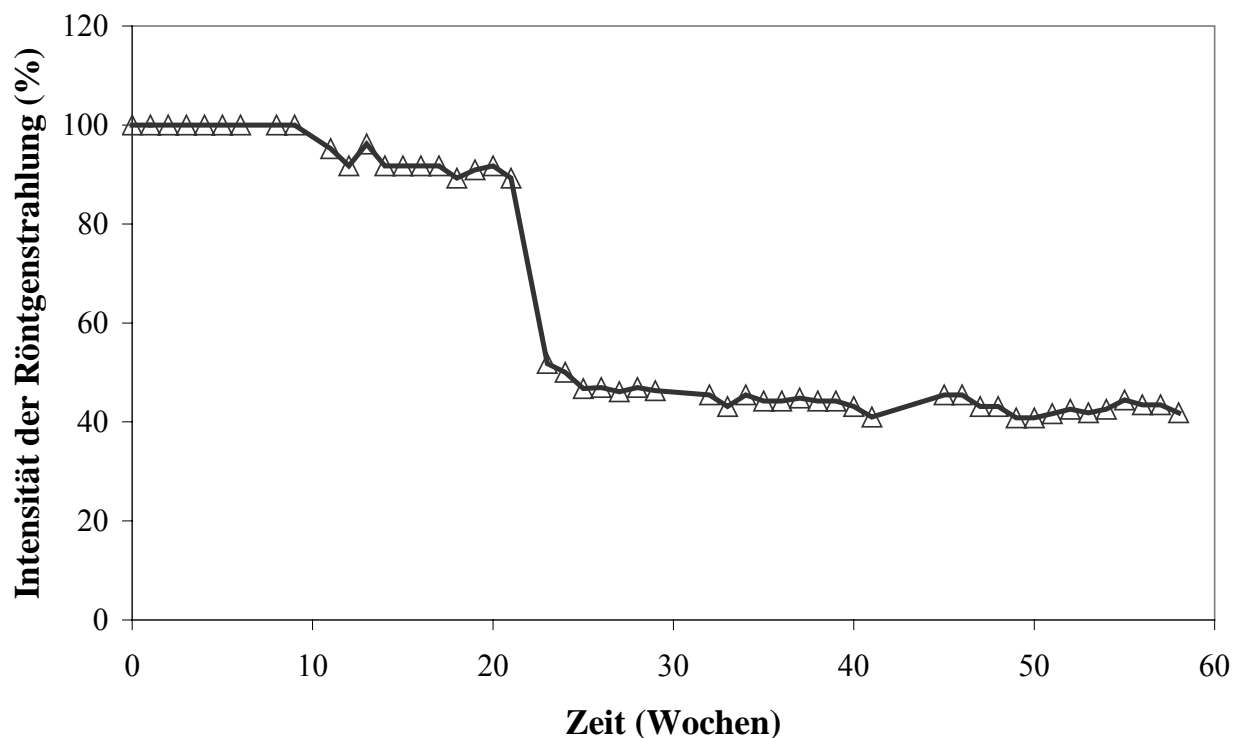


Abb. 6.15. Intensität der Röntgenröhre während der Alterung.

### **6.7.5 Amorpher Anteil im TTS und Normierung über das Flächengewicht**

Bisher erfolgte der Intensitätsabgleich innerhalb eines Systems gleicher Charge. Um die Röntgenintensitäten verschiedener Systeme und Chargen mit unterschiedlichen Flächengewichten miteinander vergleichen zu können, ist eine weitere Normierung nötig.

Die Schichtdicke der Lamine schwankt zwischen den einzelnen hergestellten Chargen, sodass die gemessenen Reflexintensitäten quantitativ nicht miteinander vergleichbar sind, denn die detektierten Strahlungsintensitäten sind, vergleichbar einer photometrischen Messung, von der Schichtdicke abhängig. Dickere Lamine gleichen Kristallisationsgrades zeigen höhere Reflexintensitäten. Um die Intensitäten aus den einzelnen Messungen dennoch miteinander vergleichen zu können, wurde auf eine konstante Schichtdicke der Matrix bzw. ein konstantes Flächengewicht von 100 g/m<sup>2</sup> normiert. Geht man von einer gleich bleibenden Dichte der Polymermatrix aus, so entspricht diese Normierung über die Masse der Standardisierung auf eine konstante Schichtdicke.

Der amorphe Anteil im TTS stellt auch bei unterschiedlichen Flächengewichten nach Normierung der Kurven eine gut reproduzierbare Größe dar. Ein amorphes TTS PLA 1 wurde mit bereits stark kristallisierten Laminen der Rezeptur TTS VER 2 unterschiedlichen Flächengewichts nach einer Lagerzeit von 2 bzw. 4 Monaten bei Raumtemperatur verglichen (Abb. 6.16). Die Kristalle in der Matrix wurden als starke Reflexe über dem amorphen Untergrund sichtbar. Unter der Annahme, dass die 10,2 % im TTS VER 2 enthaltenen Wirkstoffe nach 2 bzw. 4 Monaten zum größten Teil auskristallisiert im Polymer vorliegen, wurde der amorphe Anteil im TTS VER 2 auf 90 % geschätzt und die Placebo-Kurve zum Vergleich auf 90 % reduziert.

Vergleicht man die normierten PLA 1- und VER 2-Kurven entsprechend ihrem amorphen Anteil (Abb. 6.16), so ist trotz starker Reflexe der kristallisierten TTS-Lamine der amorphe Anteil bei den verschiedenen untersuchten Proben nahezu identisch. Der amorphe Anteil stammt von der polymeren Matrix oder den darin enthaltenen, amorph vorliegenden Arzneistoffen, denn die auf 100 g/m<sup>2</sup> normierte Kurve des TTS VER 2 ergab nach einwöchiger Lagerung einen höheren amorphen Anteil als die auskristallisierten Systeme. Dies war auf den höheren amorphen Anteil der Wirkstoffe E2 und NEA zurückzuführen.

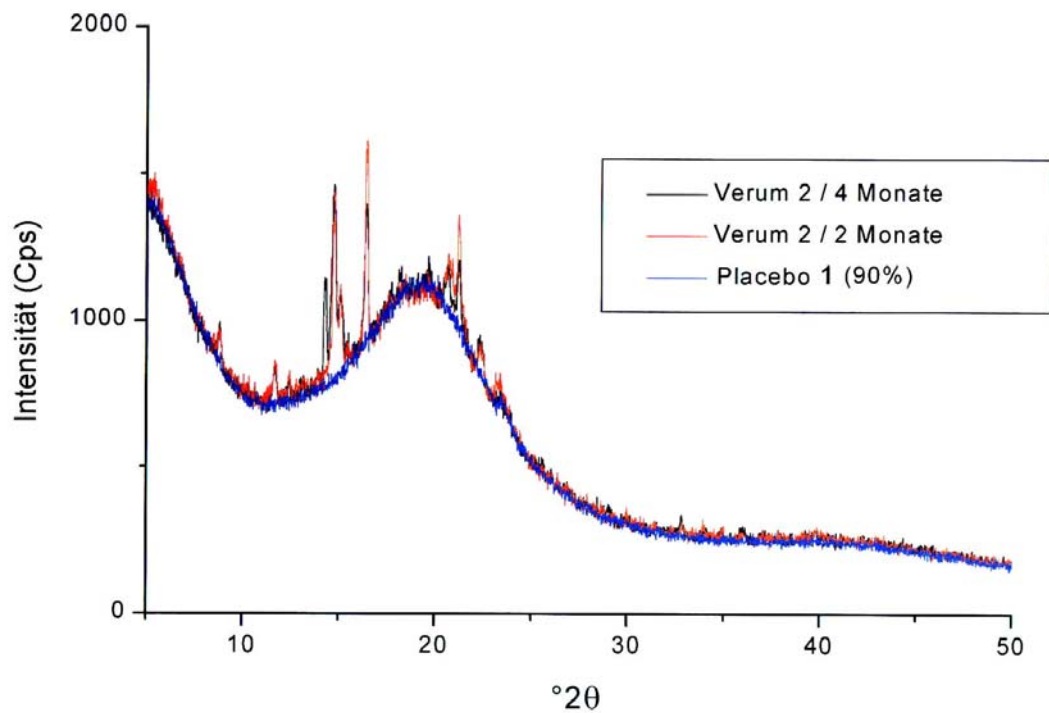


Abb. 6.16. Normierung des amorphen Anteils in den TTS VER 2 verschiedener Alterungsgrade und Chargen im Vergleich zum TTS PLA 1 (Normierung auf ein Flächengewicht von 100 g/m<sup>2</sup>).

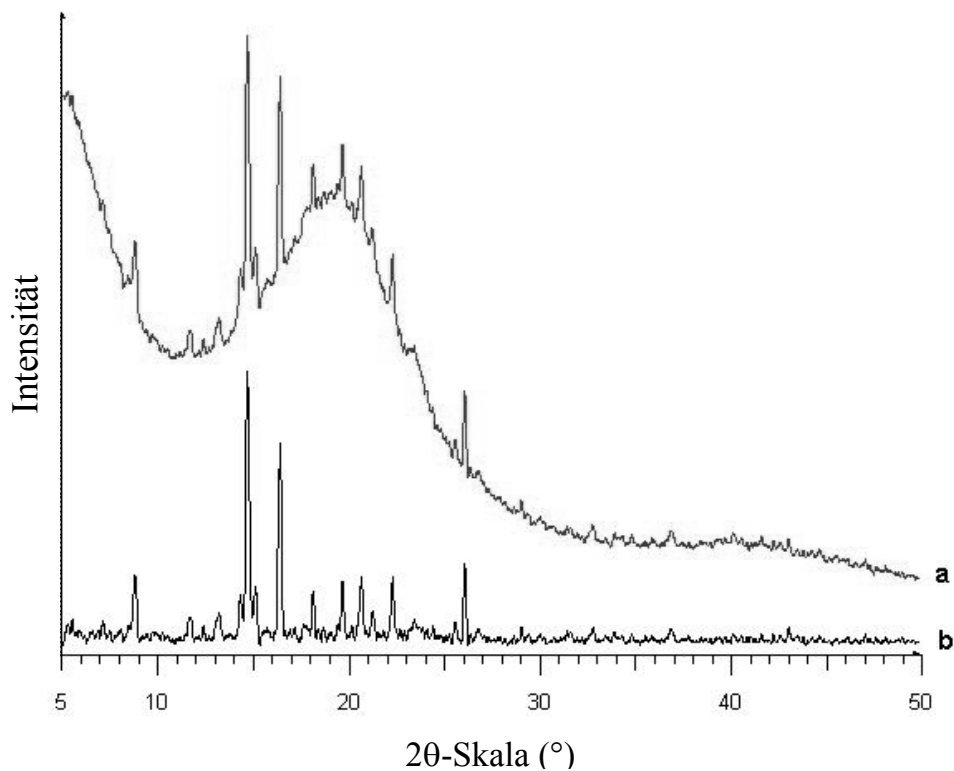


Abb. 6.17. Röntgendiagramm des TTS VER 2 nach 4-monatiger Lagerung bei Raumtemperatur (a) ohne und (b) mit Untergrundkorrektur.

Es ist also möglich, den amorphen Anteil aus den Kurven der wirkstoffhaltigen Lamine mittels Untergrundkorrektur zu entfernen, um die kristallinen Anteile besser vergleichen zu können (Abb. 6.17). Durch die Untergrundkorrektur erhält man Kurven, bei denen die Reflexe deutlicher hervortreten.

### **6.7.6 Eignung der Pulverröntgenbeugung zur Bestimmung der Kristallinität in TTS**

Anhand des TTS VER 2 wurde die Eignung der Pulverdiffraktometrie für die Bestimmung der Arzneistoffkristallinität in der amorphen Matrix von TTS untersucht. Ein TTS-Laminat wurde direkt nach der Herstellung und anschließend wiederholt im Abstand von wenigen Tagen mehrfach vermessen (Abb. 6.18). Die Lagerung erfolgte auf dem Probenhalter, um jeweils denselben Ausschnitt zu erfassen. Direkt nach der Herstellung sowie nach einer Woche war das System amorph und zeigte keine Reflexe. Die Messkurven nach längerer Lagerzeit zeigten deutliche Reflexe (Abb. 6.18c-h), die von den kristallisierten Wirkstoffen stammten, da die Polymermatrix amorph vorlag. Es ist gut zu erkennen, dass die Reflexe mit zunehmender Alterung wachsen bzw. neue Reflexe auftreten, was durch die steigende Kristallinität der Arzneistoffe bedingt ist.

Die Netto-Reflexintensitäten wurden für einige Reflexe quantitativ ausgewertet (Abb. 6.19). Für die Reflexe konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Intensitäten mit der Lagerdauer festgestellt werden, wodurch die Geschwindigkeit der Kristallisation verfolgt werden kann (Fukuoka et al. 1989). Sie verläuft, wie in Abb. 6.19 ersichtlich, zu Beginn der Messung langsam, schließlich beschleunigt und nach 21 Tagen erneut verlangsamt. Die Kristallisation kann also anhand der Reflexintensitäten quantitativ verfolgt werden.

Eine Zuordnung aller auftretenden Reflexe zu den Wirkstoffen ist nicht möglich, da das Röntgendiagramm des TTS nicht mit denen der Arzneistoffe E2-hemihydrat und NEA übereinstimmt. Der im TTS vorliegende kristalline Anteil gleicht wegen des höheren NEA-Gehaltes im Reflexmuster allerdings stärker dem des NEA als dem des E2-hemihydrats, wobei zusätzliche Reflexe auftreten, die keinem der beiden Arzneistoffe zuzuordnen sind, sondern auf neue Strukturen hindeuten.

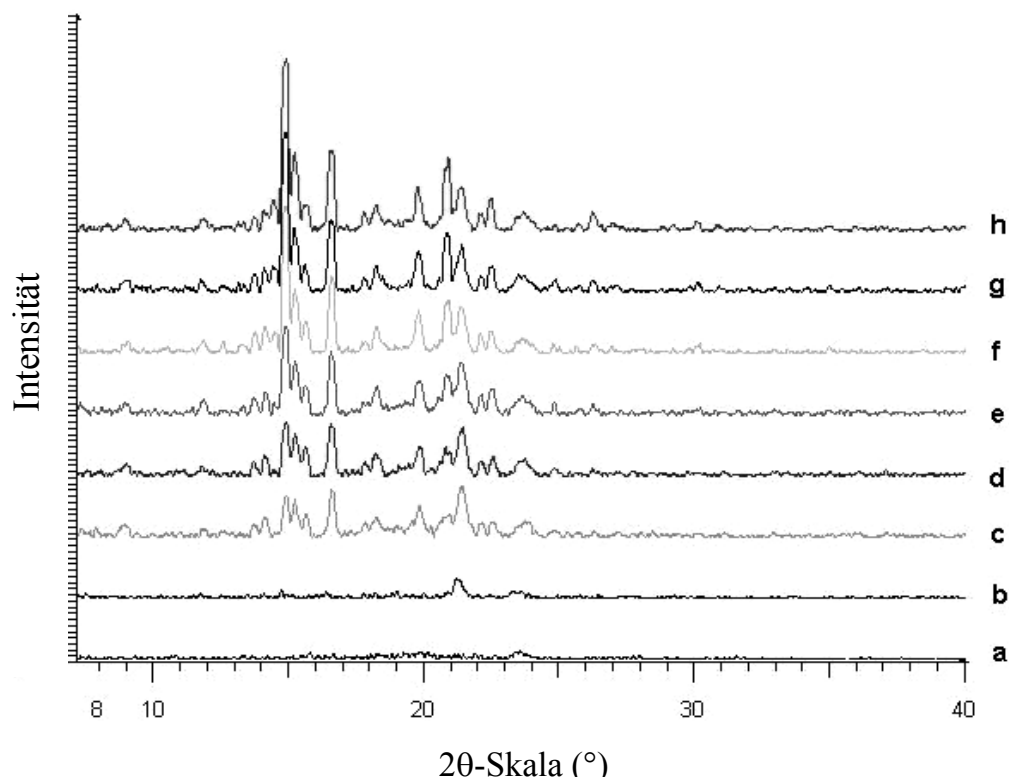


Abb. 6.18. Röntgendiagramm des TTS VER 2, das nach x Tagen wiederholt vermessen wurde: (a) 0 Tage, (b) 7 Tage, (c) 13 Tage, (d) 15 Tage, (e) 17 Tage, (f) 21 Tage, (g) 24 Tage, (h) 27 Tage.

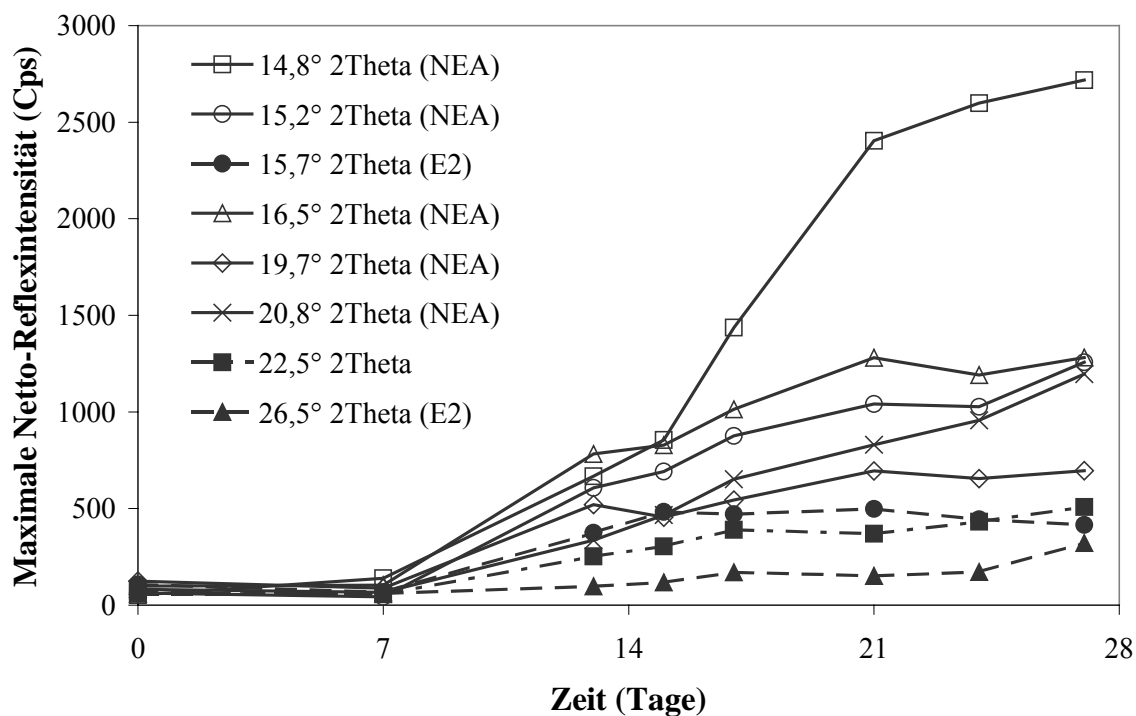


Abb. 6.19. Quantitative Auswertung der Reflexintensitäten des TTS VER 2, das nach Lagerung auf dem Probenhalter mehrfach vermessen wurde (Normierung auf ein Flächengewicht von 100 g/m<sup>2</sup>).

### **6.7.7 Auswahl der charakteristischen Reflexe**

Von den Wirkstoffen E2-hemihydrat und NEA wurden je drei charakteristische Reflexe bestimmt, die möglichst nicht durch zusätzlich auftretende Reflexe der Mischung überlagert sind (siehe 7.3.2). Die Röntgendiagramme der gealterten wirkstoffhaltigen TTS-Lamine wurden für diese ausgewählten Reflexe quantitativ ausgewertet. Ziel sollte die Bestimmung der geeignetsten Reflexe sein. Diese Reflexe sollten, um eine geringe Detektionsgrenze zu besitzen, eine hohe Intensität aufweisen und gut getrennt von anderen möglichen Reflexen vorliegen.

Das Reflexwachstum wurde für die Lamine unterschiedlichen Arzneistoffgehalts in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Als Vergleichsgröße dient die Netto-Peakfläche des Reflexes. Diese stellt die Fläche unter dem Reflex abzüglich des amorphen Untergrundes dar (Einheit:  $\text{Cps}^\circ = \text{Counts per second} \cdot \text{degree}$ ). Wegen der unterschiedlichen Flächengewichte der TTS-Lamine musste zusätzlich eine Normierung der Peakfläche auf ein konstantes Flächengewicht erfolgen, denn nur bei Betrachtung einer konstanten Schichtdicke können die Reflexintensitäten miteinander verglichen werden.

#### **6.7.7.1 Charakteristische Estradiol-Reflexe**

Bei der Alterung der E2-haltigen Lamine wurden die Netto-Peakflächen für die charakteristischen Reflexe bei  $13,1^\circ$ ,  $15,7^\circ$  und  $26,5^\circ$   $2\theta$  ausgewertet.

Der Reflex bei  $13,1^\circ$   $2\theta$  war nicht ausschließlich für E2-hemihydrat charakteristisch (Abb. 6.20). Während E2 an dieser Stelle einen starken Reflex aufwies, besaß auch NEA bei  $13,1^\circ$   $2\theta$  einen schwachen Reflex, was bei der Untersuchung von TTS mit einem hohen NEA-Anteil sichtbar wurde. Für TTS mit 12 % NEA (TTS VER 20) lag die Netto-Peakfläche dieses Reflexes im Bereich zwischen 3 % und 5 % E2-hemihydrat im TTS-Laminat (TTS VER 14 bzw. 14A). Durch die Beeinflussung der Reflexintensität durch NEA-Kristalle war die Auswertung nur für E2-haltige Lamine in Abwesenheit von NEA sinnvoll. Des Weiteren zeigte der Reflex bei  $13,1^\circ$   $2\theta$  auch bei der E2-Kristallisation starke Schwankungen. Vermutlich trat der Reflex verstärkt bei der Neubildung von E2-Kristallkeimen auf.

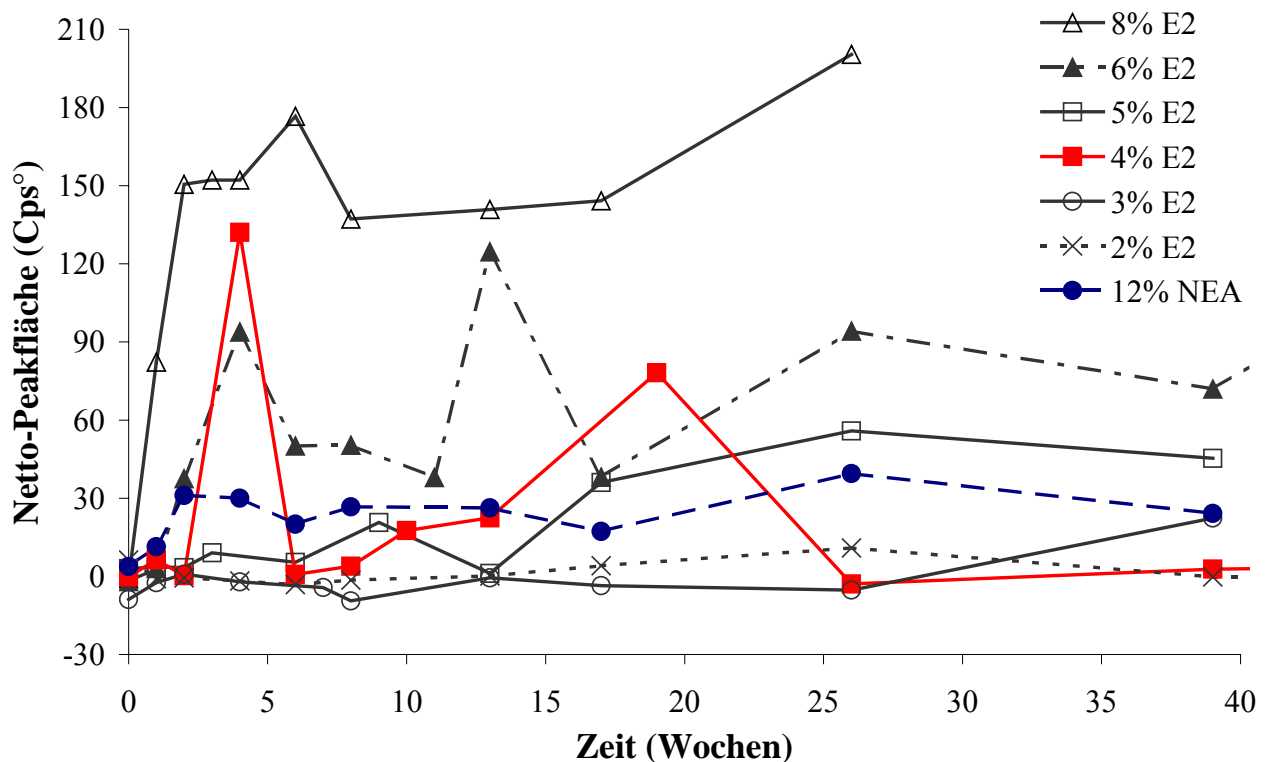


Abb. 6.20. Reflexflächen für den charakteristischen E2-Reflex bei  $13,1^\circ 2\theta$  (Normierung auf ein Flächengewicht von  $100 \text{ g/m}^2$ ).

Die Intensität des E2-Reflexes bei  $15,7^\circ 2\theta$  war wesentlich höher (Abb. 6.21), sodass die Empfindlichkeit für eine quantitative Bestimmung größer war und Messunsicherheiten einen geringeren Einfluss besaßen. Während bei  $13,1^\circ 2\theta$  erst das 4 %ige TTS einen Anstieg des Reflexes aufwies, konnte man schon bei einem Gehalt von 2 % E2 den Reflex bei  $15,7^\circ 2\theta$  beobachten. NEA-Kristalle zeigten auch bei hoher Konzentration keinen messbaren Einfluss auf diesen E2-Reflex. Er erwies sich deshalb als idealer Reflex für die quantitative Auswertung der E2-Kristallisation.

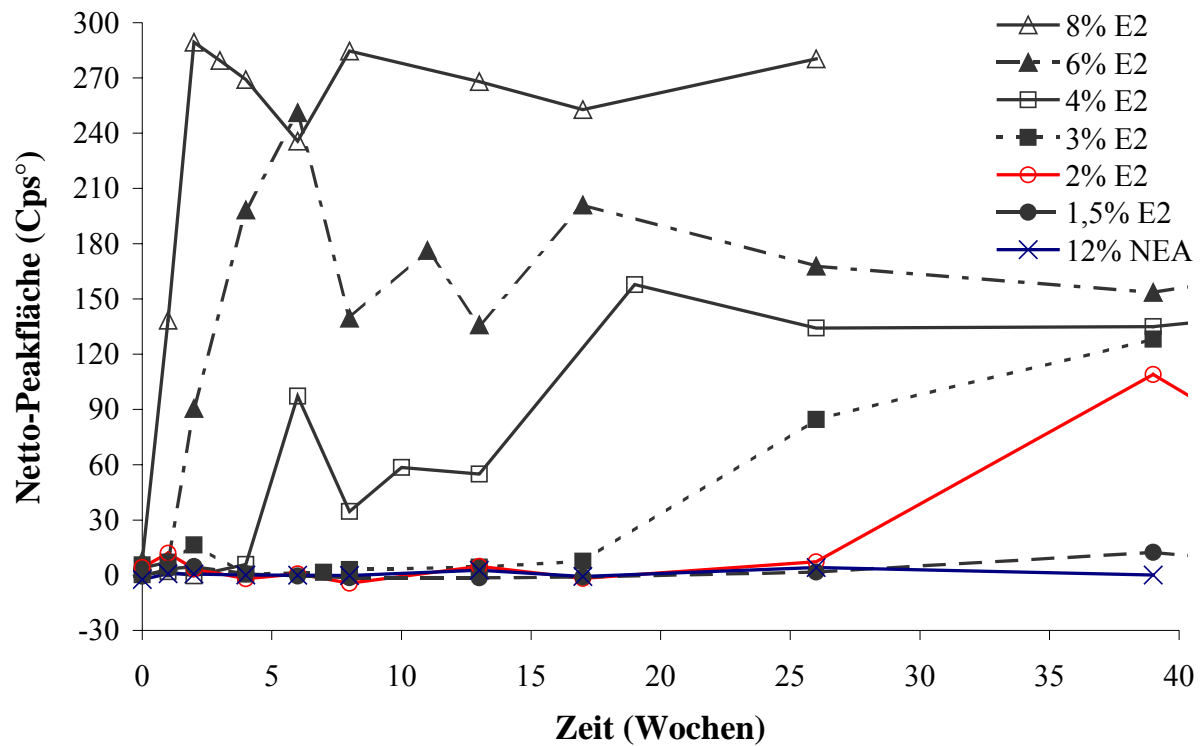


Abb. 6.21. Reflexflächen für den charakteristischen E2-Reflex bei  $15,7^\circ 2\theta$  (Normierung auf ein Flächengewicht von  $100 \text{ g/m}^2$ ).

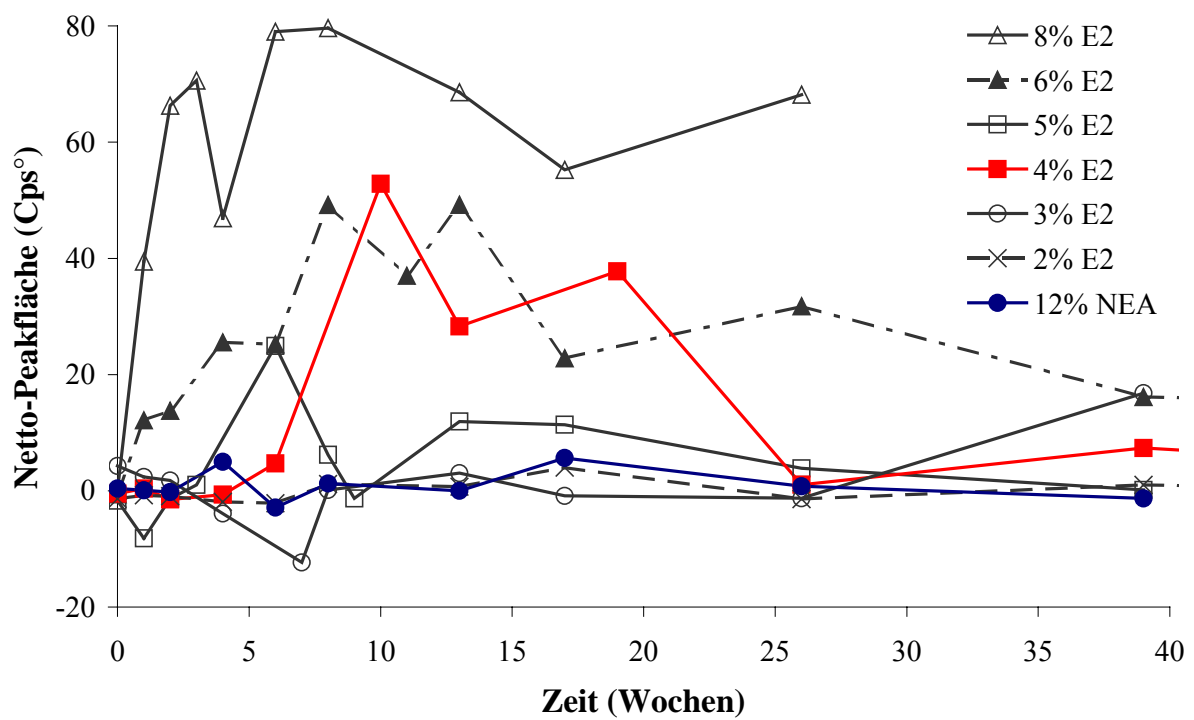


Abb. 6.22. Reflexflächen für den charakteristischen E2-Reflex bei  $26,5^\circ 2\theta$  (Normierung auf ein Flächengewicht von  $100 \text{ g/m}^2$ ).



Der E2-Reflex bei  $26,5^\circ 2\theta$  zeigte von den drei betrachteten Reflexen die mit Abstand geringste Intensität (Abb. 6.22). Die für den kristallinen Anteil gemessenen Reflexflächen lagen deshalb häufig innerhalb der Messunsicherheit, sodass eine Auswertung schwierig war. Ähnlich dem Reflex bei  $13,1^\circ 2\theta$  wurde Kristallinität erst ab einem E2-Gehalt von 4 % im TTS erfasst, wobei starke Schwankungen der einzelnen Messungen die Analyse erschwerten.

Der E2-Reflex bei  $15,7^\circ 2\theta$  hat sich deshalb für die quantitative Analytik des Kristallisationsgrades als am besten geeignet erwiesen, da er die höchste Intensität und damit auch Empfindlichkeit aufweist.

#### **6.7.7.2 Charakteristische NEA-Reflexe**

Für die NEA-haltigen TTS war die Zunahme der Kristallinität mit einem Anstieg der Reflexintensitäten bei  $14,8^\circ$ ,  $16,5^\circ$  und  $20,8^\circ 2\theta$  verbunden (Abb. 6.23 bis Abb. 6.25). Die Reflexintensitäten waren höher als die des E2-hemihydrat und die E2-haltigen TTS zeigten keine Intensitätsüberlagerungen in diesen Bereichen. Bei allen ausgewählten Reflexen waren Peakflächen ab einer NEA-Konzentration von 8 % im Laminat detektierbar, wobei die Kristallisation bereits nach 2 Wochen Lagerung bei Raumtemperatur nachweisbar war.

Der geringste Zusammenhang zwischen Kristallinität und Messwert schien für den Reflex bei  $16,5^\circ 2\theta$  zu existieren (Abb. 6.24). Alle kristallisierten Systeme enthielten nach 20-wöchiger Lagerung unabhängig vom NEA-Gehalt die gleiche Kristallmenge. Zwischen den beiden Signalen bei  $20,8^\circ 2\theta$  und  $21,3^\circ 2\theta$  war häufig keine Basislinientrennung vorhanden. Dennoch stieg bei quantitativer Auswertung des Reflexes bei  $20,8^\circ 2\theta$  die Kristallinität wie erwartet mit der Lagerdauer an (Abb. 6.25). Die größte Korrelation zeigte der Reflex bei  $14,8^\circ 2\theta$ , da dieser auch die höchste Intensität besaß.

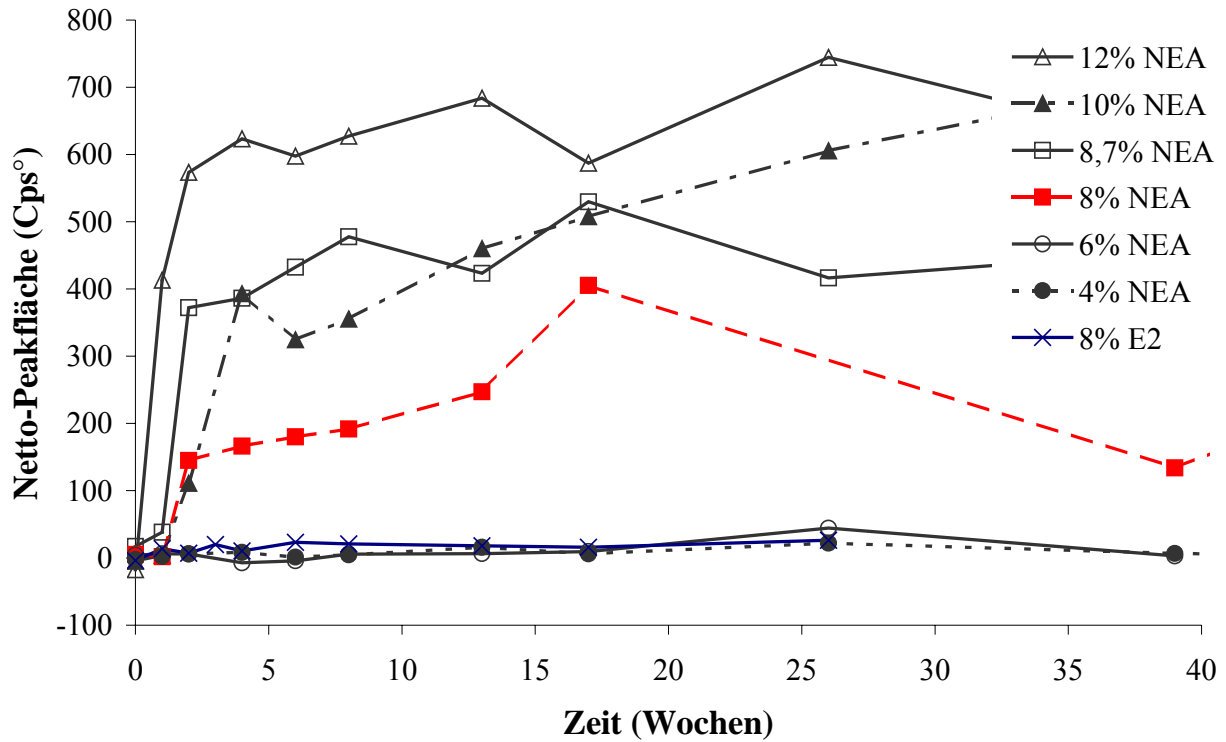


Abb. 6.23. Reflexflächen für den charakteristischen NEA-Reflex bei  $14,8^\circ 2\theta$  (Normierung auf ein Flächengewicht von  $100 \text{ g/m}^2$ ).

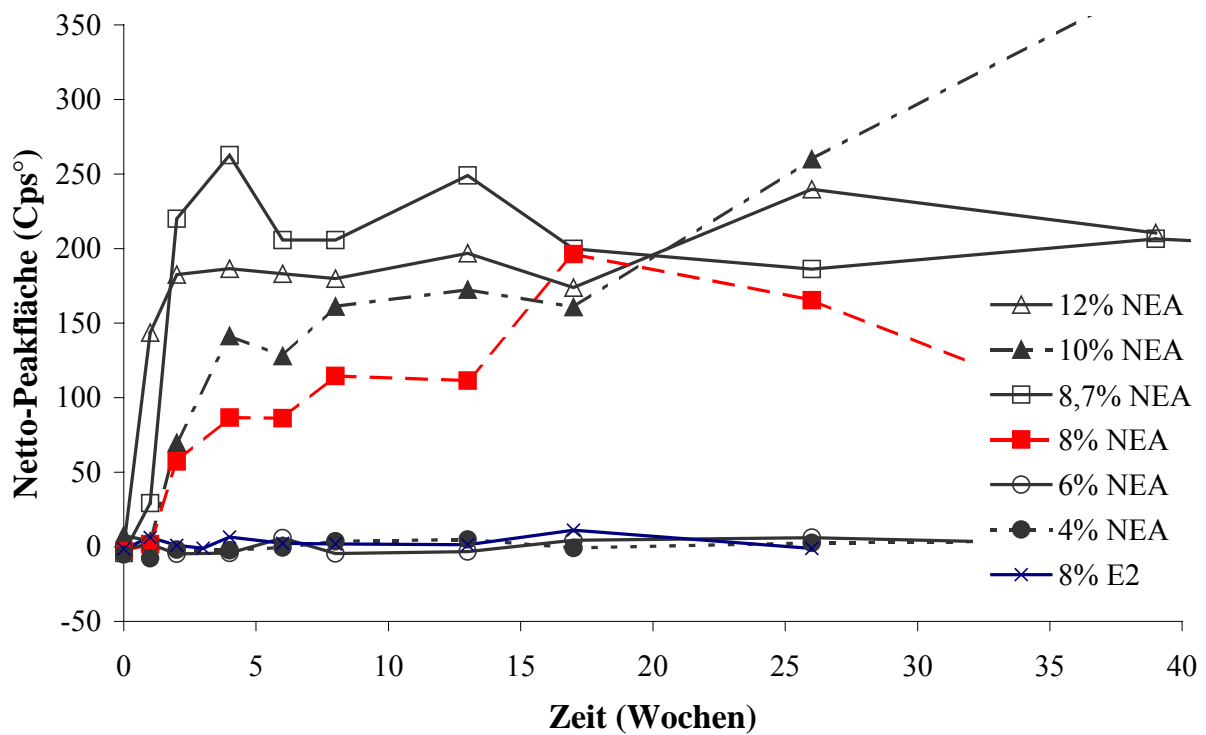


Abb. 6.24. Reflexflächen für den charakteristischen NEA-Reflex bei  $16,5^\circ 2\theta$  (Normierung auf ein Flächengewicht von  $100 \text{ g/m}^2$ ).

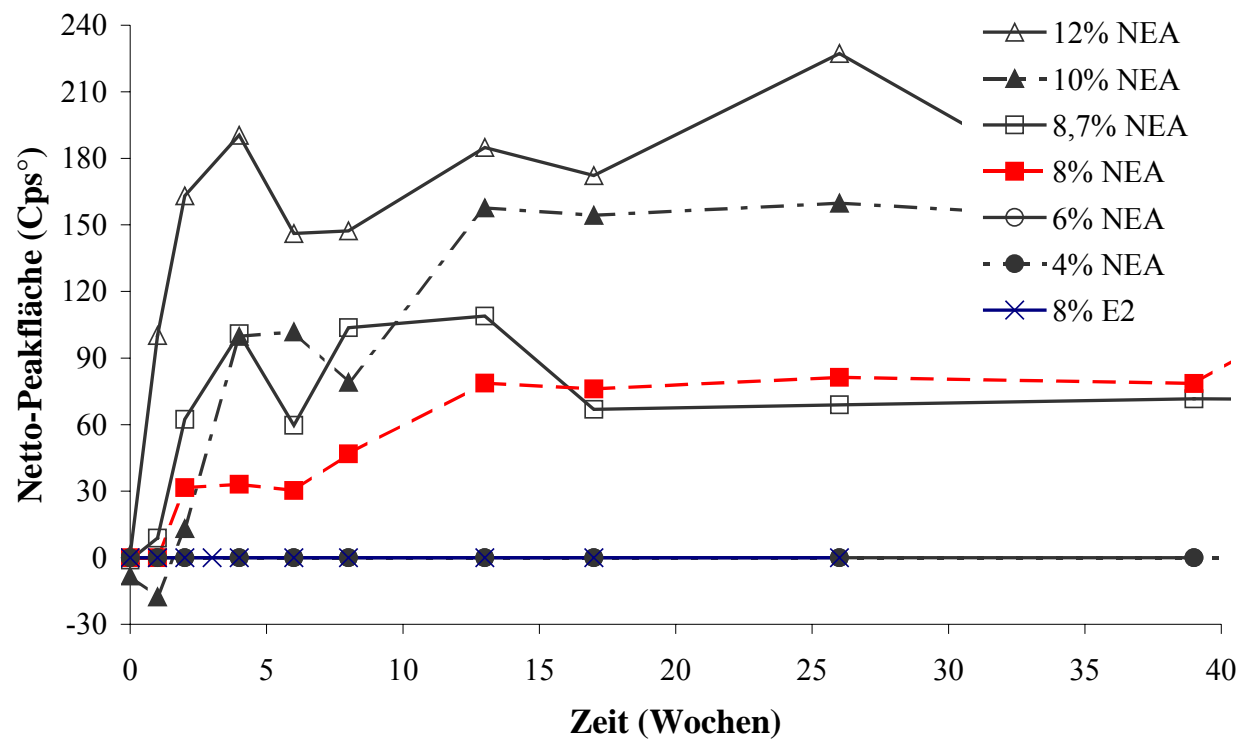


Abb. 6.25. Reflexflächen für den charakteristischen NEA-Reflex bei  $20,8^\circ 2\theta$  (Normierung auf ein Flächengewicht von  $100 \text{ g/m}^2$ ).

## 6.8 HPLC-Analytik

Die quantitative Bestimmung der Zersetzung von E2-hemihydrat und NEA im TTS wurde mithilfe der Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) durchgeführt. Die verwendete Methode wurde durch die Firma Lohmann Therapie-Systeme (LTS) entwickelt.

### 6.8.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

#### 6.8.1.1 Chemikalien

Estradiol-hemihydrat, mikronisiert	Lohmann Therapie-Systeme, Andernach
Norethisteronacetat	Lohmann Therapie-Systeme, Andernach
Estron	Lohmann Therapie-Systeme, Andernach
Ethanol	Merck Eurolab, Darmstadt
Methanol (HPLC-Qualität)	Merck Eurolab, Darmstadt
Tetrahydrofuran (THF pro analysis)	Merck Eurolab, Darmstadt
Deionisiertes Wasser Milli-Q-plus	Millipore GmbH, Eschborn

#### 6.8.1.2 Verbrauchsmaterialien

Parafilm „M“	Eppendorf, Hamburg
micro test tubes 1 ml	Eppendorf, Hamburg
HPLC-Probengläser mit Deckel und Dichtscheibe	Medchrom, Heidelberg
RC 58 Membranfilter 0,2 µm Ø 47 mm	Schleicher & Schuell, Dassel

#### 6.8.1.3 Geräte

Ultra-pure Water System Milli-Q plus	Millipore GmbH, Eschborn
Membranpumpe MZ 2C Synchro	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Analysenwaage Toledo AB 204	Mettler Toledo, Nänikon (Schweiz)

Magnet-Heiz-Rührer RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg

#### HPLC-Anlage

C18-Säule Hibar <sup>®</sup> 250-4	Merck Eurolab, Darmstadt
Hitachi L-6220 Intelligent Pump, Modell Gradient	Merck Eurolab, Darmstadt
HPLC-System LaChrom Autosampler L-7200	Merck Eurolab, Darmstadt
HPLC-System LaChrom Column Oven L-7350	Merck Eurolab, Darmstadt
LC-Spectrophotometer Lambda-Max Model 481	Millipore Waters, Eschborn
Software: Kontron PC-Integrator Version 3.90 (1992)	Kontron Instruments AG

## 6.8.2 Methode

### 6.8.2.1 Probenvorbereitung

Aus den TTS-Laminaten wurden mit einem Stanzeisen Scheiben der Größe 19,9 cm<sup>2</sup> ausgestanzt. Mithilfe von ebenso ausgestanzten Folienstücken der Abdeck- und Abziehfolie konnte der Masseauftrag ausgewogen werden. Die Abdeckfolie des Laminates wurde mit Methanol gereinigt, um lösliche Verunreinigungen, die in der HPLC fälschlicherweise mitdetektiert werden könnten, zu entfernen. Anschließend wurde die Abziehfolie entfernt und das Laminat zusammen mit 50,0 ml einer Ethanol-Methanol-Mischung 50:50 (V/V) (HPLC-Qualität) in einen Schliffkolben überführt. Der Kolben wurde mit einem geeigneten Schliffstopfen und mit Parafilm dicht verschlossen und die Lösung mindestens 18 Stunden auf dem Magnetrührer bei 600 Upm rühren gelassen. Ein Aliquot der entstandenen Lösung wurde 10 min bei 10000 Upm in micro test tubes zentrifugiert und der Überstand als Probenlösung für die HPLC-Analytik verwendet. Von dieser Lösung wurden je 20 µl mit einem Autosampler in die HPLC-Anlage eingespritzt.

### 6.8.2.2 Analysenbedingungen bei der Bestimmung mittels HPLC

Zur Trennung von E2-hemihydrat, NEA und deren Zersetzungsprodukten wurde eine Reversed Phase-HPLC durchgeführt (Tab. 6.8). Die Elution erfolgte mithilfe eines Fließmittelgradienten (Tab. 6.9). Die Fließmittel wurden zur Entfernung von Partikeln und zur Entgasung unter Vakuum durch ein 0,2 µm-Membranfilter gesaugt.

Trennsäule	C 18 gepackt, 4 x 250 mm innerer Durchmesser, 5 µm Partikelgröße, Edelstahl (Hibar <sup>®</sup> 250-4, Merck)
Säulentemperatur	40°C
Mobile Phase	Laufmittel A: Methanol/THF/deionisiertes Wasser 15:22:63 (V/V/V) Laufmittel B: Methanol/THF/deionisiertes Wasser 25:25:50 (V/V/V)
Flussrate	0,8 ml/min
Druck	140 bar
Injektionsvolumen	20 µl
Stoppzeit	60 min
Detektion	UV-photometrisch bei 220 nm für die E2-Zersetzungsprodukte bzw. bei 245 nm für die NEA-Zersetzungsprodukte

Tab. 6.8. Analysenbedingungen bei der Bestimmung von E2 und NEA mittels HPLC.

Zeit (min)	Laufmittel A (Vol.-%)	Laufmittel B (Vol.-%)
0	100	0
49,0	100	0
49,1	0	100
55,0	0	100
55,1	100	0

Tab. 6.9. Fließmittelgradient.

Die Elution erfolgte in den ersten 49 min mit dem Fließmittel A und anschließend 6 Minuten mit dem Fließmittel B. Die mobile Phase B besaß einen höheren organischen

Anteil und damit eine höhere Elutionskraft. Die Hilfsstoffe sollten dadurch von der Säule entfernt werden.

### 6.8.3 Validierung

#### 6.8.3.1 Standard-Lösungen zur Identifizierung der beiden Arzneistoffe

Ungefähr 20 mg E2-hemihydrat bzw. 100 mg NEA wurden genau gewogen und in 100,0 ml einer Mischung aus Ethanol/Methanol 50:50 (V/V) gelöst. Es empfahl sich, für NEA eine Stammlösung mit 1 mg/ml und für E2-hemihydrat die Stammlösung mit 0,2 mg/ml anzusetzen, da diese Konzentrationen etwa der Probenlösung eines TTS VER 2 bei einer Fläche von 19,9 cm<sup>2</sup> und einem Flächengewicht von 280 g/m<sup>2</sup> entsprachen.

Die Stammlösungen wurden auf 0,02 mg/ml (2 %) für NEA und auf 0,01 mg/ml (5 %) für E2-hemihydrat verdünnt, um die Empfindlichkeit der Methode zu bestimmen.

#### 6.8.3.2 NEA-Standard

Die NEA-Stammlösung ergab nach einer Retentionszeit von ungefähr 40 min (Abb. 6.26) eine Peakfläche von  $1,1054 \pm 0,0224$  mV·min für eine Konzentration von 1 µg/ml (Tab. 6.10). Die Peakfläche konnte gut reproduziert werden, sie zeigte eine Standardabweichung von 2 % zwischen den Messungen.

	NEA-Stammlösung	Standard I	Standard II
NEA-Konzentration (mg/ml)	1,002	0,0201	0,01005
Peakfläche (mV·min)	1107,6	22,359	13,07
Peakfläche A <sub>NEA</sub> für 1 µg/ml	$1,1054 \pm 0,0224$	1,1124	1,3005
Standardabweichung	2,02 %		
Probenanzahl n	4	1	1

Tab. 6.10. NEA-Stammlösung: Auswertung der Peakflächen bei 245 nm.

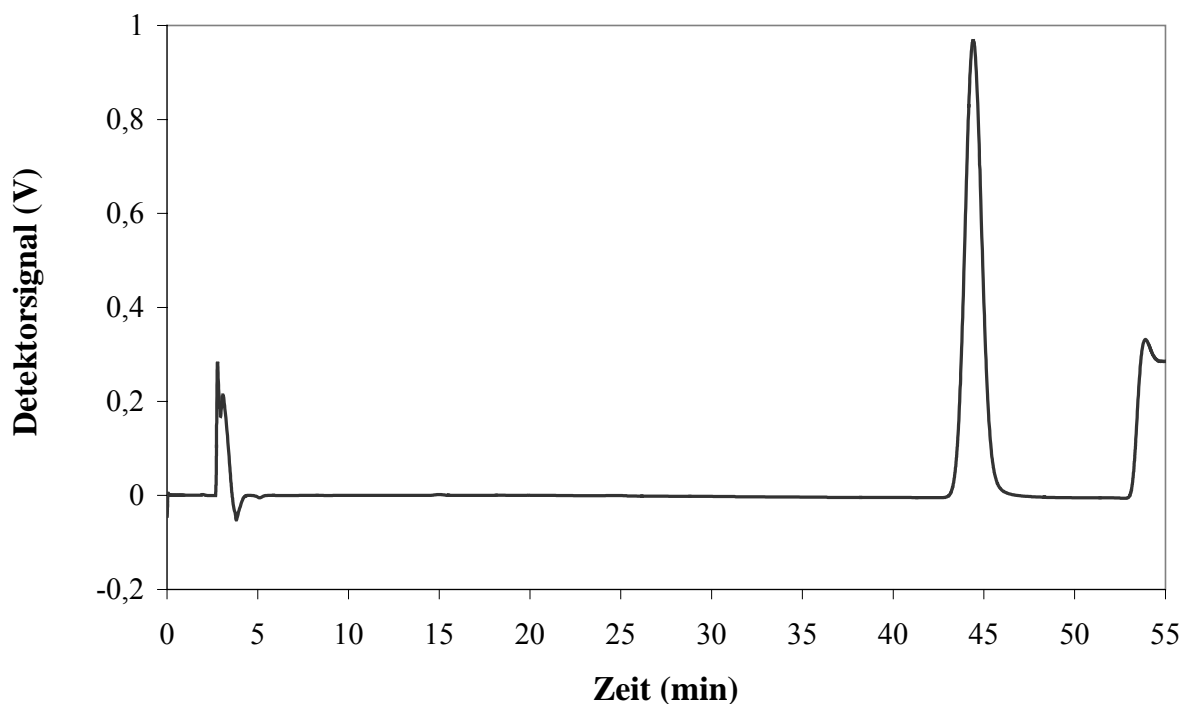


Abb. 6.26. Exemplarisches HPLC-Chromatogramm der NEA-Stammlösung (1,002 mg/ml) bei 245 nm.

Durch Verdünnung der Stammlösung wurde die Detektionsgrenze bestimmt. Sie lag für NEA unter 1 % der Probenkonzentration, da eine Konzentration von 10,05 µg/ml noch einen deutlichen Peak lieferte.

Die Retentionszeit unterlag einigen Schwankungen. Bereits eine kurze Standzeit der Fließmittel im HPLC-Kreislauf, z.B. über Nacht, führte zur Verdunstung der leichter flüchtigen, hydrophoben Komponenten und damit zu einer geringeren Elutionskraft. Dadurch verlängerten sich die Retentionszeiten zum Teil um einige Minuten.

### 6.8.3.3 Estradiol-Standard

Die mobilen Phasen zeigten bei der Messwellenlänge von 220 nm für E2-hemihydrat eine starke Absorption, was auf die Eigenabsorption des Lösungsmittels Tetrahydrofuran unterhalb von 230 nm (Cut-off-Wellenlänge) zurückzuführen war. Die Basislinie war nicht so stabil wie bei 245 nm (Abb. 6.27).



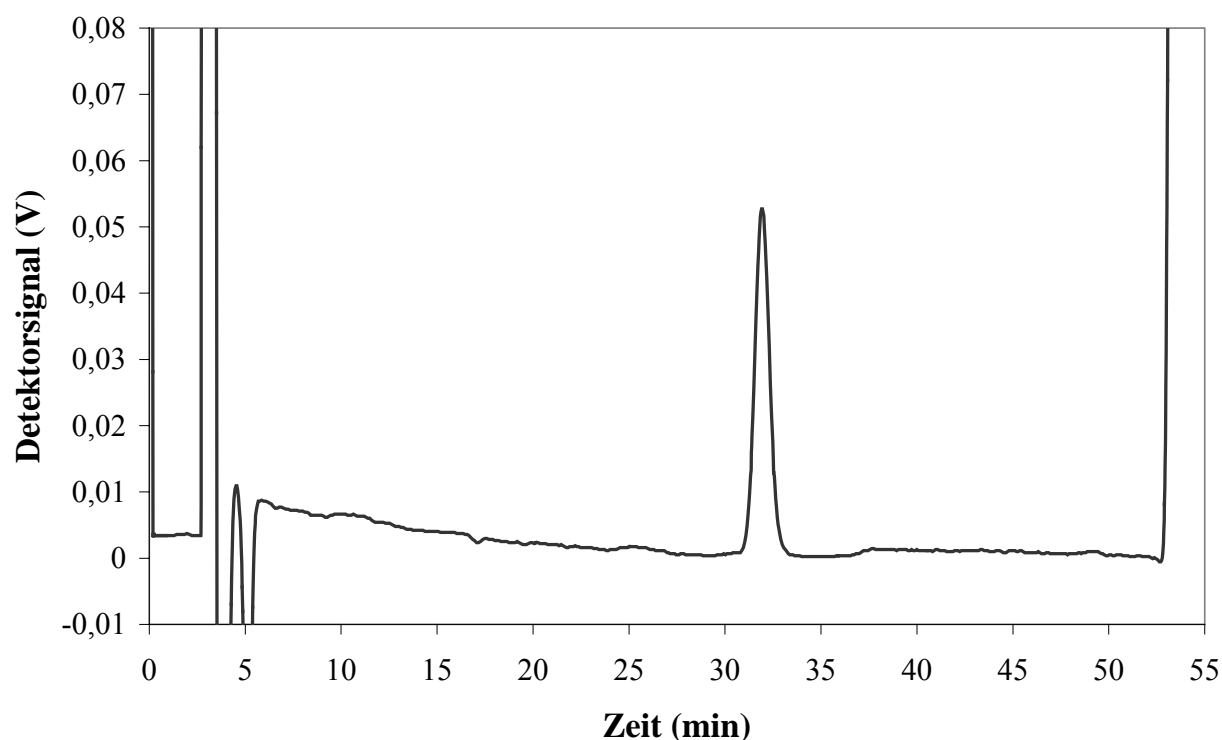


Abb. 6.27. Exemplarisches HPLC-Chromatogramm der E2-hemihydrat-Stammlösung (0,201 mg/ml) bei 220 nm.

	E2-hemihydrat- Stammlösung	Standard I	Standard II
Konzentration (mg/ml)	0,201	0,01005	0,00201
Peakfläche (mV·min)	61,005	1,8987	0,51351
Peakfläche $A_{E2}$ für 1 $\mu$ g/ml	$0,3035 \pm 0,0154$	0,1889	0,2555
Standardabweichung	5,07 %		
Probenanzahl n	3	1	1

Tab. 6.11. E2-hemihydrat-Stammlösung: Auswertung der Peakflächen bei 220 nm.

E2 besaß eine Retentionszeit von 30 min. Die Peakfläche betrug  $0,3035 \pm 0,0154$  mV·min für eine Konzentration von 1  $\mu$ g/ml E2-hemihydrat (Tab. 6.11). Die Peakflächenbestimmung für E2-hemihydrat zeigte wegen der hohen Eigenabsorption des Fließmittels bei der Messwellenlänge stärkere Schwankungen und eine Standardabweichung von 5 %.

Eine Auswertung von Zersetzungsprodukten war durch das starke Rauschen der Basislinie nicht mit so hoher Empfindlichkeit wie bei NEA möglich. Die Detektionsgrenze von E2-hemihydrat lag bei 1 %.

#### 6.8.3.4 Estron-Standard

##### 6.8.3.4.1 Bestimmung des Responsfaktors

Neben den Wirkstoffen wurden auch die Peakflächen für die jeweiligen Zersetzungsprodukte bestimmt, wobei Estron hier als Beispiel dargestellt werden soll. Aus den Peakflächen für E2-hemihydrat (0,3035 mV·min) und Estron (0,3105 mV·min) bei 220 nm ergab sich ein Responsfaktor R von 1,02 (Tab. 6.12 und Tab. 6.13).

	Estron-Stammlösung
Estron-Konzentration (mg/ml)	0,204
Peakfläche (mV·min)	63,347
Peakfläche $A_{\text{Estron}}$ für 1 µg/ml	0,3105±0,0329
Standardabweichung (n=3)	10,6 %

Tab. 6.12. Estron-Stammlösung: Auswertung der Peakflächen bei 220 nm.

##### 6.8.3.4.2 Selektivität bei der Bestimmung von Estron

Alle Zersetzungsprodukte sollten vollständig voneinander und vom Wirkstoffpeak getrennt vorliegen, damit eine selektive Bestimmung möglich war. Der Vergleich der Retentionszeiten in Tab. 6.13 zeigte, dass Estron von allen detektierten Zersetzungsprodukten zum Arzneistoff den geringsten Unterschied in der relativen Retentionszeit besaß. Deshalb wurde das Trennvermögen der HPLC-Methode anhand einer Mischung der Stammlösungen von E2-hemihydrat und Estron im Verhältnis 4:1 untersucht (Abb. 6.28). Die Peaks von E2-hemihydrat und Estron wiesen eine annähernd vollständige Basislinientrennung auf.

$\lambda$ (nm)	Substanzen	Retentions- zeit (min)	relative Re- tentionszeit	Respons- faktor $R_{ZP}$	Peakfläche (mV·min)/( $\mu$ g/ml)
220	E2-hemihydrat	30,0	1,00		0,3035
	Estriol		0,31	1,00	
	$\Delta$ 9(11)-Estradiol		0,64	2,02	
	Estron		1,06	1,02	0,3105
	17 $\alpha$ -Estradiol		1,16	1,05	
245	NEA	40,0	1,00		1,1054
	Nordion		0,30	1,23	
	6 $\beta$ -Hydroxy-NEA		0,35	0,72	
	6 $\alpha$ -Hydroxy-NEA		0,43	0,72	
	Norethisteron		0,49	1,13	

Tab. 6.13. Übersicht über die Retentionszeiten und Responsfaktoren von E2-hemihydrat und NEA sowie deren Zersetzungsprodukten.

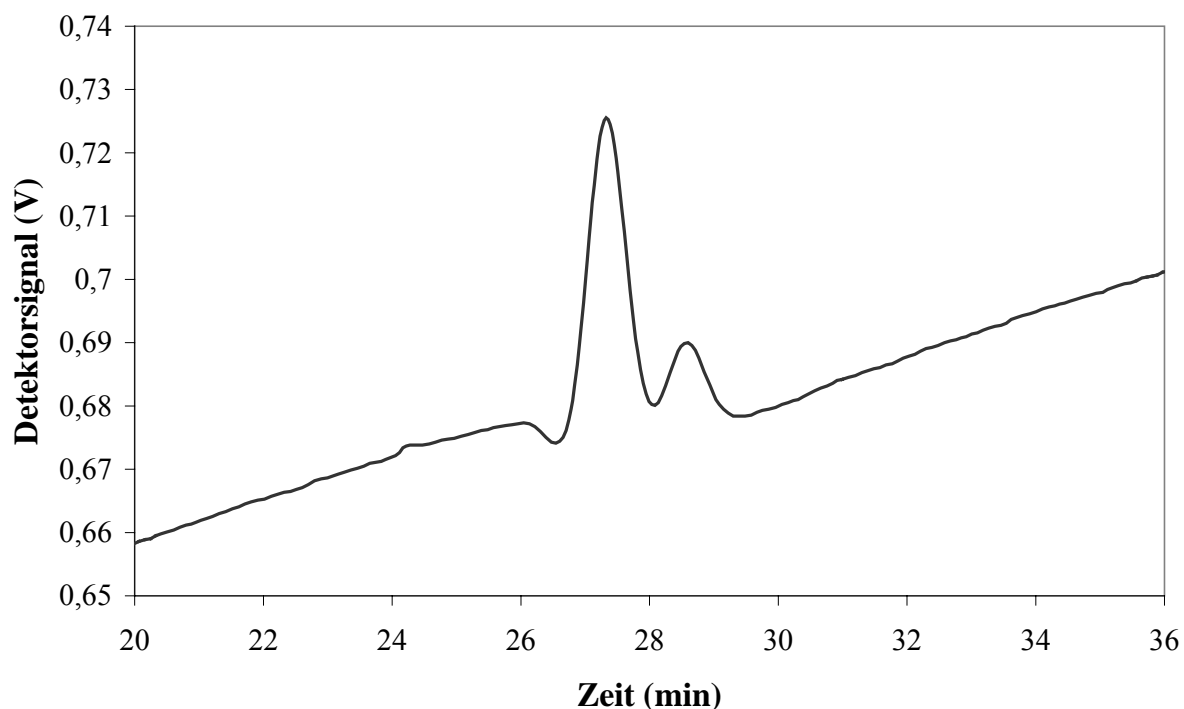


Abb. 6.28. Exemplarisches HPLC-Chromatogramm der Trennung von E2-hemihydrat und Estron im Verhältnis 4:1 bei 220 nm.

### 6.8.3.5 Zersetzungsprodukte und Datenauswertung

Die verschiedenen Zersetzungsprodukte von E2-hemihydrat und NEA zeigten unterschiedliche Retentionszeiten, was ihre Identifizierung sowie eine selektive quantitative Bestimmung von Wirkstoffen und Zersetzungsprodukten ermöglichte (Tab. 6.13).

Die UV-Absorption ist von der Struktur abhängig und unterscheidet sich deshalb bei den Zersetzungsprodukten und Arzneistoffen. Um eine Quantifizierung der Zersetzungsprodukte zu ermöglichen, war die Bestimmung der Peakflächen aller Zersetzungsprodukte bei der entsprechenden Wellenlänge nötig. Mithilfe der Peakflächen der Arzneistoffe  $A_{AS}$  und deren Zersetzungsprodukten  $A_{ZP}$  war es möglich, das Verhältnis der Absorptionswerte, die sogenannten Responsfaktoren  $R$ , zu berechnen. Die Responsfaktoren  $R$  geben das Verhältnis der Peakflächen zueinander an (Gl. 51) und dienen zur quantitativen Auswertung der Zersetzungsprodukte.

$$\text{Responsfaktor } R_{ZP} = \frac{A_{ZP}}{A_{AS}} \quad \text{Gl. 51}$$

Aus den in Tab. 6.13 zusammengefassten Größen lässt sich der Grad der Zersetzungsprodukte nach Gl. 52 berechnen.  $A_i$  stellt die Peakfläche des jeweiligen Zersetzungsproduktes  $i$  im Chromatogramm und  $R_i$  den Responsfaktor dieses Zersetzungsproduktes dar. Der Divident beschreibt die Summe aus den Quotienten der jeweiligen Fläche von Arzneistoff  $A_{AS}$  bzw. allen Zersetzungsprodukten  $A_{ZP}$  in der Messkurve und den entsprechenden Responsfaktoren  $R_{ZP}$ . Der theoretische Responsfaktor des Arzneistoffes beträgt 1 und entfällt deshalb bei der Berechnung.

$$\text{Zersetzungsprodukt } i (\%) = \frac{A_i \cdot 100}{R_i \left( \sum A_{AS} + \left( \frac{A_{ZP}}{R_{ZP}} \right) \right)} \quad \text{Gl. 52}$$

## 7 Analytik der Arzneistoffe

### 7.1 E2-hemihydrat

E2-hemihydrat wurde mithilfe der DSC untersucht. Der endotherme Schmelzpeak lag bei 177°C, wobei die Schmelzwärme  $103,6 \pm 1,4$  J/g (29,2 kJ/mol) betrug (Abb. 7.1). Der endotherme Peak in der Schmelzkurve mit dem Maximum bei 130°C stammt aus der Desolvatisierung des Hemihydrats. Unter der Annahme einer Wasserverdampfungsenthalpie von 40,6 kJ/mol (Darcy & Buckton 1998) ergibt sich für die Desolvatisierung von E2-hemihydrat ein theoretischer Wert von 72,2 J/g, was mit dem gemessenen Wert von  $72,9 \pm 13,0$  J/g bei 130°C in guter Übereinstimmung steht. Nach Variankaval et al. (2000) ist die Freisetzung des Kristallwassers bei 130°C jedoch unvollständig, denn mithilfe der Thermogravimetrie wurde nachgewiesen, dass beide endothermen Peaks mit einem Verlust des Lösungsmittels verbunden sind. Man kann sagen, dass E2-hemihydrat in zwei Stufen desolvatisiert, die erste bei circa 120°C und die zweite bei 174°C. Der Schmelzpeak bei 177°C wäre demnach der Desolvatisierung überlagert, sodass die ermittelte Schmelzwärme mit einem Fehler behaftet ist, der vom Anteil des Wasserverlusts der beiden Stufen abhängig ist. Ein Gewichtsverlust von 3,2 % entspricht  $\frac{1}{2}$  mol Kristallwasser.

Viele Arzneistoffe kristallisieren nicht aus, wenn sie unter ihren Schmelzpunkt abgekühlt werden, sondern bilden eine amorphe, unterkühlte Flüssigkeit. Wird das bei 220°C geschmolzene und auf 25°C abgekühlte, amorphe E2-hemihydrat mit einer Heizrate von 10°C/min wieder erwärmt (Abb. 7.1), so zeigt sich bei 82,3°C ein endothermer Relaxationspeak des Glasübergangs, der eine generelle Eigenschaft von amorphem Material darstellt. Dieser Wert stimmt mit den Literaturangaben von 81°C überein (Fukuoka et al. 1989, Byrn et al. 1995, Kerc & Srcic 1995, Hülsmann et al. 2001). Oberhalb der Glasübergangstemperatur kommt es bei 120°C zur Rekristallisation (Hülsmann et al. 2001). Die Rekristallisationsenthalpie beträgt –60 J/g.

Der Schmelzpeak des aus der glasig erstarrten Schmelze rekristallisierten Estradiols war niedriger als der des Ausgangsstoffs E2-hemihydrat. Er lag bei 166°C und entspricht dem

Schmelzpunkt der instabilen wasserfreien Modifikation II des Estradiols (siehe Tab. 6.2). Die Schmelzenthalpie der instabilen Modifikation II lag bei 80,6 J/g.

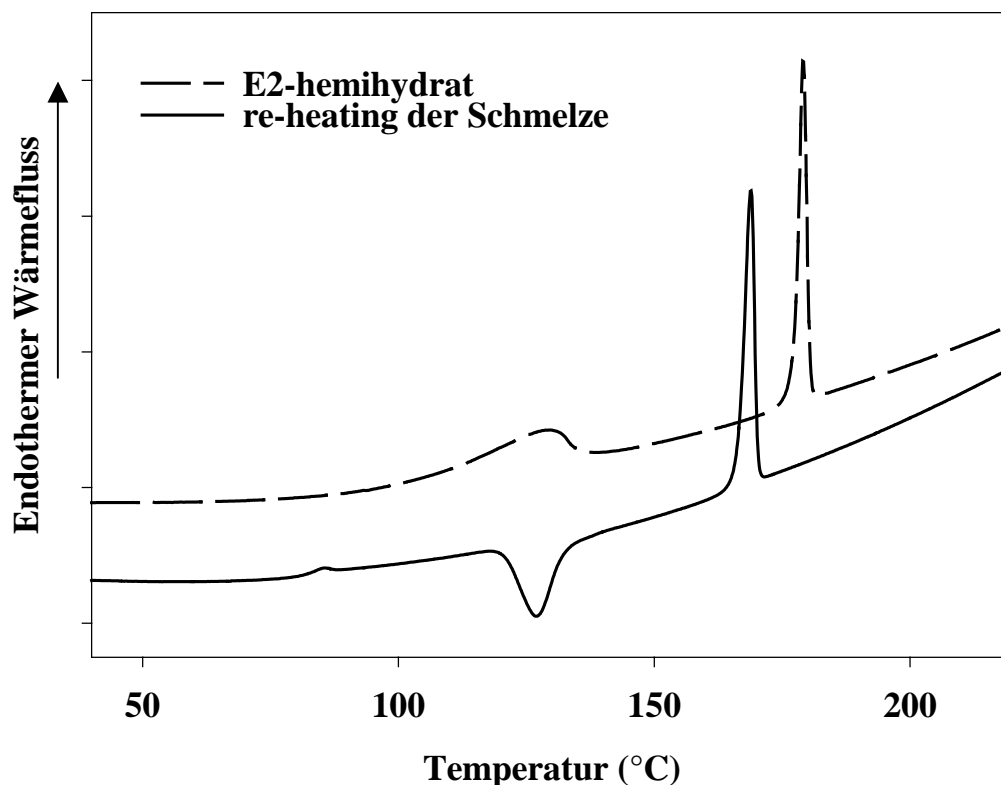


Abb. 7.1. DSC-Kurve von mikronisiertem E2-hemihydrat sowie Rekristallisation des Estradiols beim Re-heating nach Abkühlung auf 25°C (Kühl- und Heizrate: 10°C/min), Normierung auf 1 mg.

## 7.2 Norethisteronacetat (NEA)

Auch NEA wurde mittels DSC-Messung untersucht. Der Schmelzpunkt lag bei 161°C und die Schmelzwärme betrug  $73,2 \pm 1,9$  J/g (24,9 kJ/mol). Im Gegensatz zum Estradiol zeigte sich ein scharfer Schmelzpeak (Abb. 7.2).

Die Glasübergangstemperatur des NEA ließ sich nicht mit ausreichender Genauigkeit aus der Schmelze durch Wiedererwärmen bestimmen. Um dennoch die Glasübergangstemperatur abschätzen zu können, wurden verschiedene Mischungsverhältnisse aus E2-hemihydrat und NEA geschmolzen und zu einer amorphen Schmelze abgekühlt. Bei allen untersuchten Mischungen zeigte sich im Re-heating-Scan ein endothermer Peak, dessen Lage vom Mischungsverhältnis der Hormone abhängig war (Abb. 7.3 und Tab. 7.1).

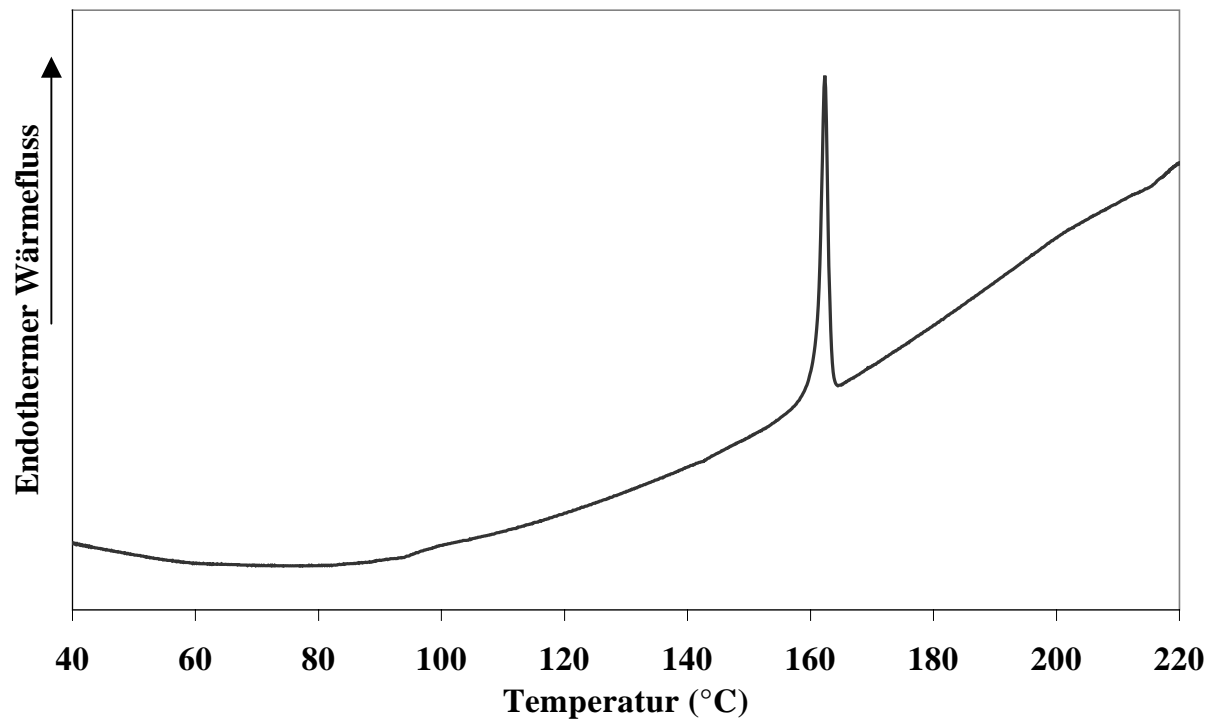


Abb. 7.2. DSC-Kurve von kristallinem Norethisteronacetat (Normierung auf 1 mg).

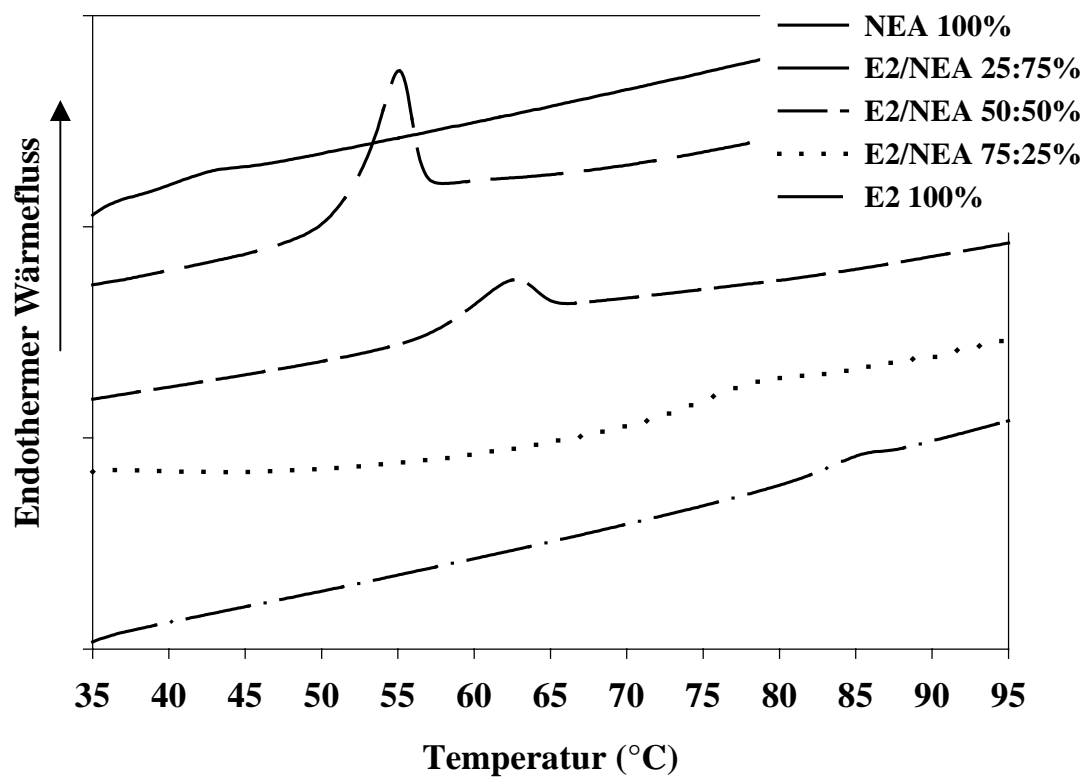


Abb. 7.3. Anormaler endothermer Relaxationspeak der amorphen Schmelzen aus E2-hemihydrat und NEA (Scanningrate: 10°C/min).

Gewichtsfraction NEA	$T_{g_{mix}}$ (°C)	berechnete $T_{g_{NEA}}$ (°C)
0	82,3	
0,25	72,3	45,4
0,50	57,3	35,6
0,75	51,9	42,9
1	38,6	38,6
Mittelwert		$40,6 \pm 4,4$

Tab. 7.1. Glasübergangstemperaturen der E2-NEA-Schmelzen bei einer Scanningrate von 10°C/min. Die Glasübergangstemperaturen wurden als Onset-Temperaturen bestimmt.

Die Glasübergangstemperatur einer Komponente sinkt durch Zugabe eines Weichmachers mit niedrigerer Glasübergangstemperatur nicht-linear ab. Die Glasübergangstemperatur  $T_{g_{mix}}$  eines amorphen Feststoffs, welcher aus zwei Komponenten besteht, kann durch die Fox-Gleichung (Gl. 53) beschrieben werden (Vidts et al. 1998, Hino & Ford 2001).

$$\frac{1}{T_{g_{mix}}} = \frac{w_1}{T_{g_1}} + \frac{w_2}{T_{g_2}} \quad \text{Gl. 53}$$

$w_1$  und  $w_2$  stellen die Gewichtsfractionen der Komponenten 1 und 2,  $T_{g_1}$  bzw.  $T_{g_2}$  die entsprechenden Glasübergangstemperaturen dar. Entspricht der theoretische Wert dem gemessenen, kann man davon ausgehen, dass sich die beiden Stoffe über den untersuchten Bereich ideal mischen.

Aus den experimentell bestimmten Glasübergangstemperaturen der E2-NEA-Schmelzen konnte nach Gl. 53 die Glasübergangstemperatur von NEA unter der Voraussetzung, dass es sich um eine ideale Mischung handelt, berechnet werden (Tab. 7.1). Sie betrug  $40,6 \pm 4,4^\circ\text{C}$  bei einer Scanningrate von 10°C/min. Da keine systematische Abweichung der berechneten Werte mit steigender Gewichtsfraction erkennbar ist, kann von einer idealen Mischung der beiden Wirkstoffe ausgegangen werden.



	Tg (°C)	Smp (°C)	Tg/Smp (K/K)
Methyltestosteron	-3	148	0,64
Progesteron	6	126	0,70
Norethisteronacetat*	41	161	0,72
Norethynodrel	51	180	0,72
Chlormadinonacetat	61	210	0,69
β-Estradiol-3-benzoat	63	199	0,71
β-Estradiol	81 / 78	172	0,80 / 0,79
β-Estradiol*	82	177	0,79

\*eigene Daten

Tab. 7.2. Übersicht über die Glasübergangstemperaturen und Schmelztemperaturen verschiedener Steroidhormone (nach Fukuoka et al. 1989, Kerc & Srcic 1995, Byrn et al. 1995).

In Tab. 7.2 sind die Glasübergangs- sowie Schmelztemperaturen von einigen Steroidhormonen zusammengefasst. Es fällt auf, dass der Tg/Smp-Quotient für diese niedrig-molekularen Arzneistoffe im Bereich zwischen 0,6 und 0,8 liegt (Fukuoka et al. 1989, Kerc & Srcic 1995).

### 7.3 Wirkstoffkombination von Estradiol und NEA

Es wurden Formulierungen mit verschiedenen Anteilen E2-hemihydrat und NEA hergestellt und untersucht. Um das gemeinsame Verhalten der beiden Wirkstoffe aufzuklären, wurden E2-hemihydrat und NEA in Form einer Konzentrationsreihe mit zunehmendem bzw. abnehmendem Verhältnis in Ethylacetat gelöst, das Lösungsmittel bei Raumtemperatur verdunstet und die gewonnenen Kristalle auf ihre Kristallstruktur hin untersucht.

### 7.3.1 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Die Kristallgemische wurden mittels DSC untersucht. Aus Ethylacetat kristallisiertes E2 zeigte einen anderen DSC-Verlauf. Statt eines scharfen Schmelzpeaks zeigte sich ein Doppelpeak mit 172°C und 177°C als Onset-Temperaturen (Abb. 7.4).

Bei den Arzneistoffmischungen entstand eine Vielzahl von Schmelz- bzw. Phasenumwandlungspeaks (Abb. 7.4 und Tab. 7.3). Es handelte sich entweder um eine Mischung aus verschiedenen kristallinen Substanzen oder die Kristalle wandelten sich infolge der Temperaturerhöhung in stabilere Modifikationen um. Bei unterschiedlichen Verhältnissen zwischen E2 und NEA zeigten sich verschiedene Peakkombinationen. Auffallend war der häufig auftretende Peak bei 145°C, der zwischen 10 und 80 % E2-Anteil entstand. Hierbei könnte es sich um ein Eutektikum zwischen den Hormonen handeln.

Peakmaximum	127°C	145°C	151°C	155°C	160°C	164°C NEA	177°C Estradiol
Estradiol : NEA							
90:10				+		+++	+++
80:20		+	+	+		+++	++
70:30		+	+	++		+++	+
60:40		++	+		+++	++	+++
50:50		+++			++	++	++
40:60	+	++		+	+	+	++
30:70	+	+++		++	+	+	++
20:80	+	++		++		+	
10:90		+++		+			

Tab. 7.3. Zusammensetzung der Wirkstoffmischung (kristallisiert aus Ethylacetat) und beobachtete DSC-Peaks.

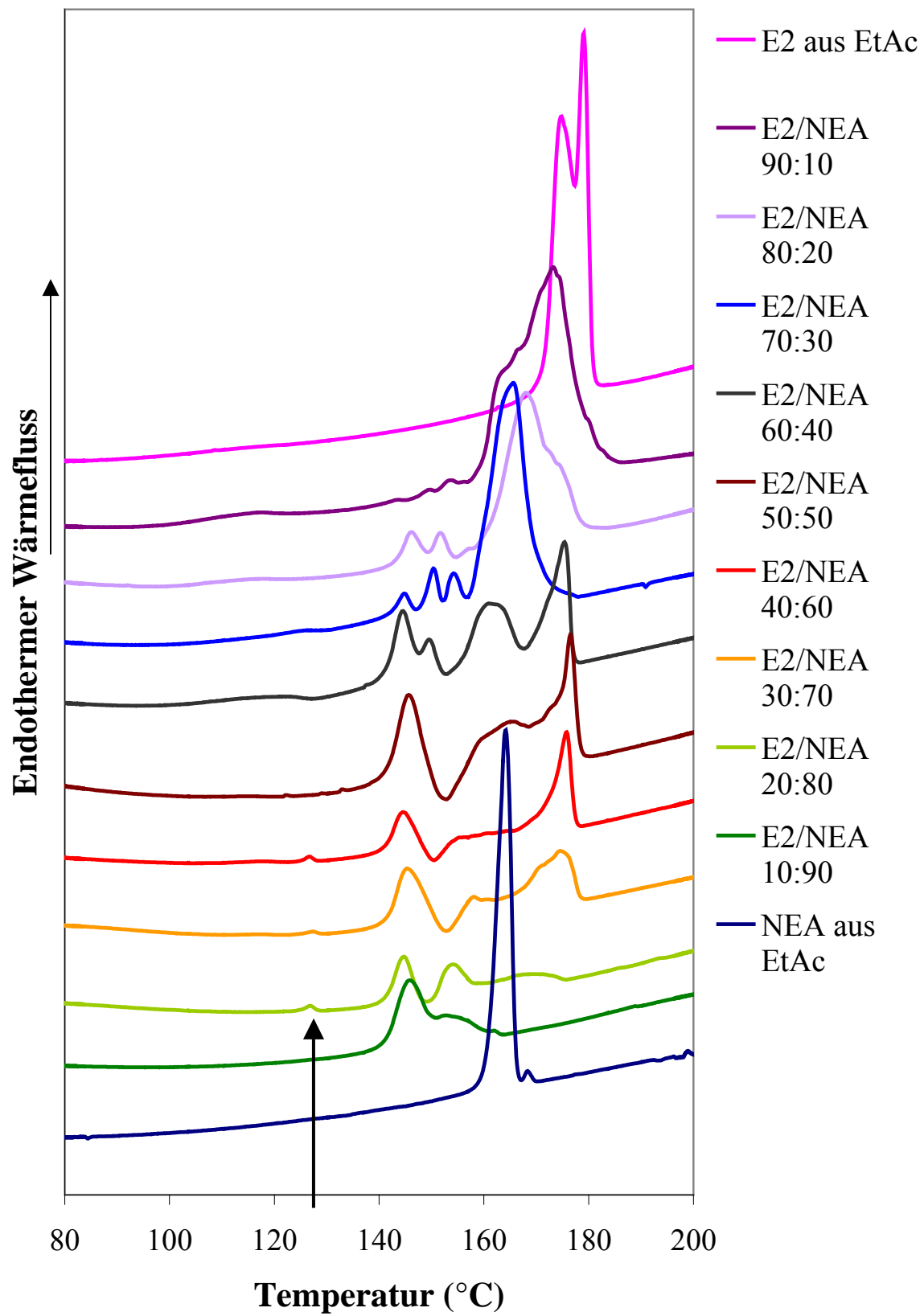


Abb. 7.4. DSC-Kurven der E2-NEA-Kristalle nach Kristallisation aus Ethylacetat.

### 7.3.2 Pulverröntgenbeugung

Das Reflexmuster der rekristallisierten Mischung zeigte nicht nur die Reflexe des E2-hemihydrats und der NEA-Kristalle, sondern eine Vielzahl von unterschiedlichen Peaks, die den Arzneistoffen nicht zugeordnet werden konnten (Abb. 7.5).

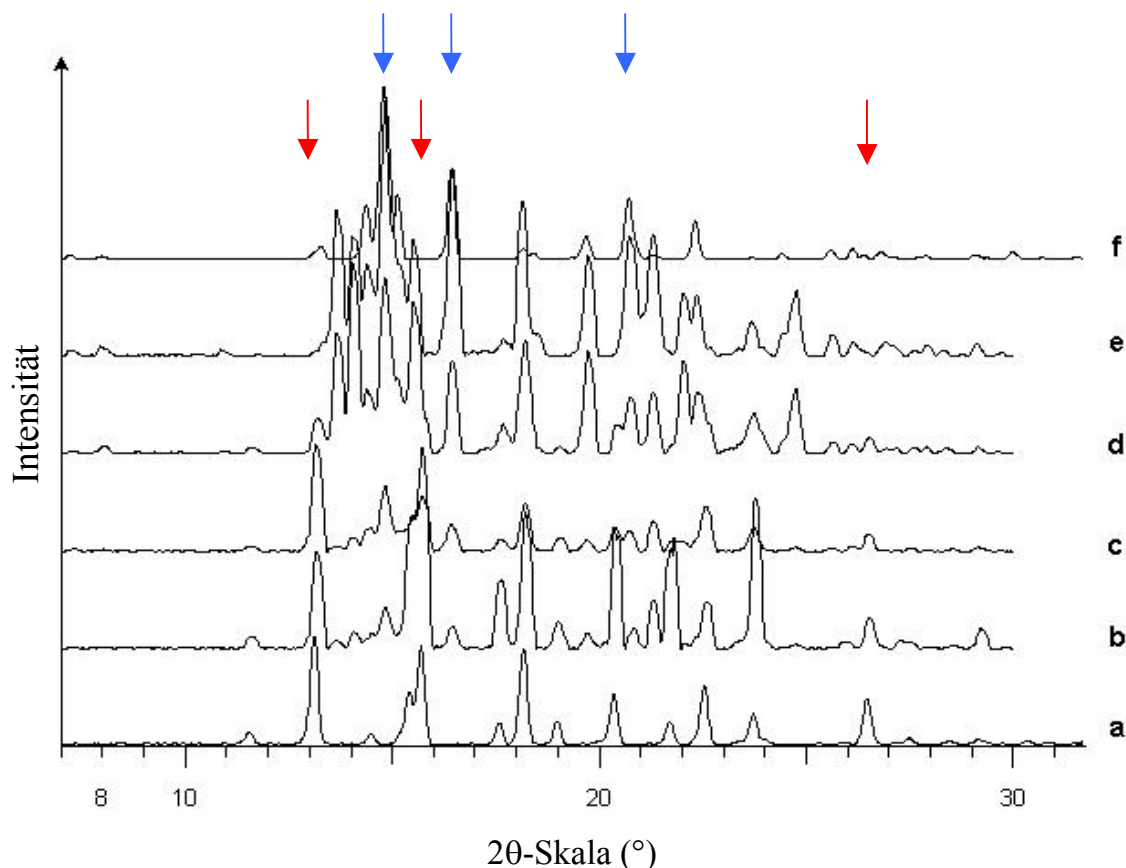


Abb. 7.5. Röntgendiagramm der E2-NEA-Mischungen kristallisiert aus Ethylacetat: (a) E2-hemihydrat, (b) E2/NEA 80:20, (c) E2/NEA 60:40, (d) E2/NEA 40:60, (e) E2/NEA 20:80 und (f) Norethisteronacetat (NEA).

Es ergab sich kein kontinuierlicher Übergang des Reflexmusters vom E2-hemihydrat über die verschiedenen Mischungen zum NEA. Aber eine abnehmende Konzentration des einen Arzneistoffes führte zum Verschwinden seines typischen Reflexmusters (Abb. 7.6 und Abb. 7.7). Allerdings traten in den Wirkstoffmischungen spontan neue Reflexe auf, die sich von

den beiden Hormonen unterschieden (Abb. 7.8) und auf das Auftreten neuer Kristallphasen<sup>4</sup> als Kombination der beiden Arzneistoffe schließen lassen. Eine Phasenbildung ist erleichtert, da beide Wirkstoffe in orthorhombischer Elementarzelle kristallisieren.

Die Bestimmung der neuen Kristallstruktur aus den zusätzlichen Peaks war durch die Komplexität des Reflexmusters nicht möglich. Es ist zu erwarten, dass einige der Reflexe der neuen Kristalle unter denen der Ausgangsstoffe liegen, wie z.B. der NEA-Reflex bei  $19,7^\circ 2\theta$ , der durch einen Reflex der Wirkstoffmischung überlagert wird.

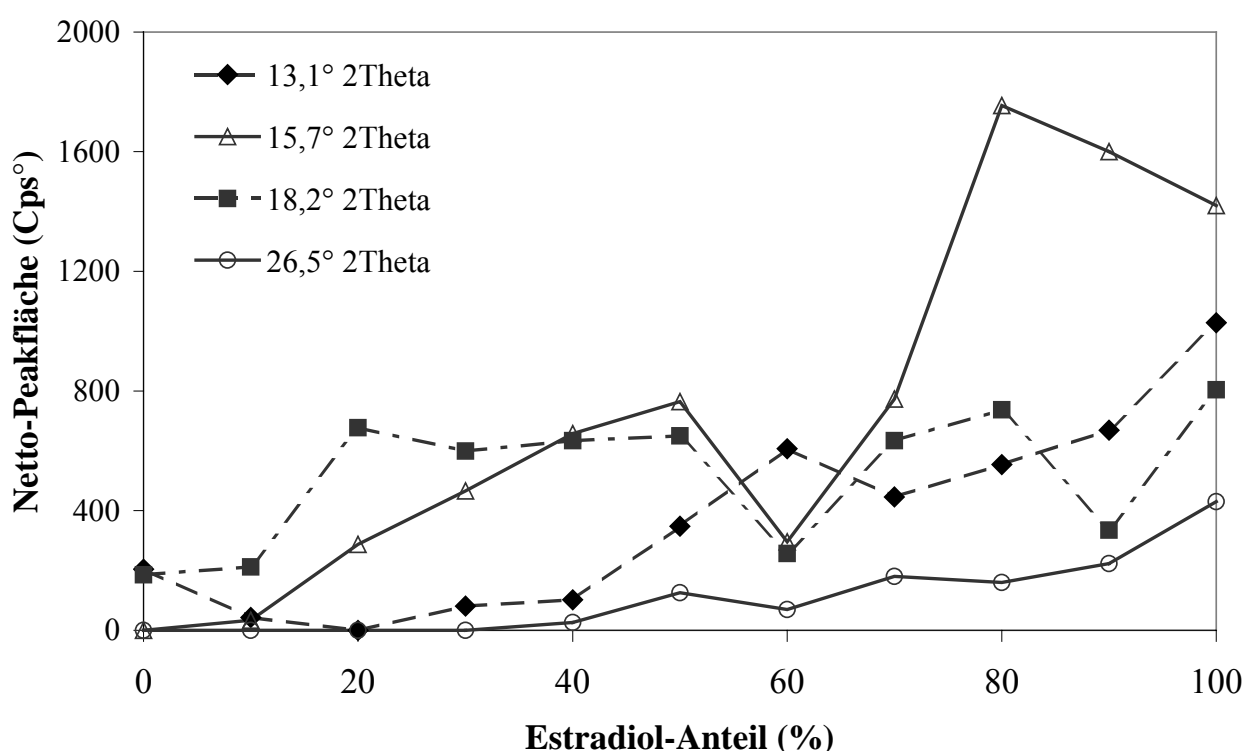


Abb. 7.6. Reflexintensitäten der E2-Reflexe in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Wirkstoffmischung (auskristallisiert aus Ethylacetat).

<sup>4</sup> Das Auftreten von Mischkristallen bedeutet den substitutionellen Einbau von Molekülen eines zweiten Stoffes in ein Kristallgitter, wobei sich die Abmessungen der Elementarzelle kontinuierlich ändern. Das Reflexmuster verschiebt sich dadurch ebenfalls kontinuierlich.

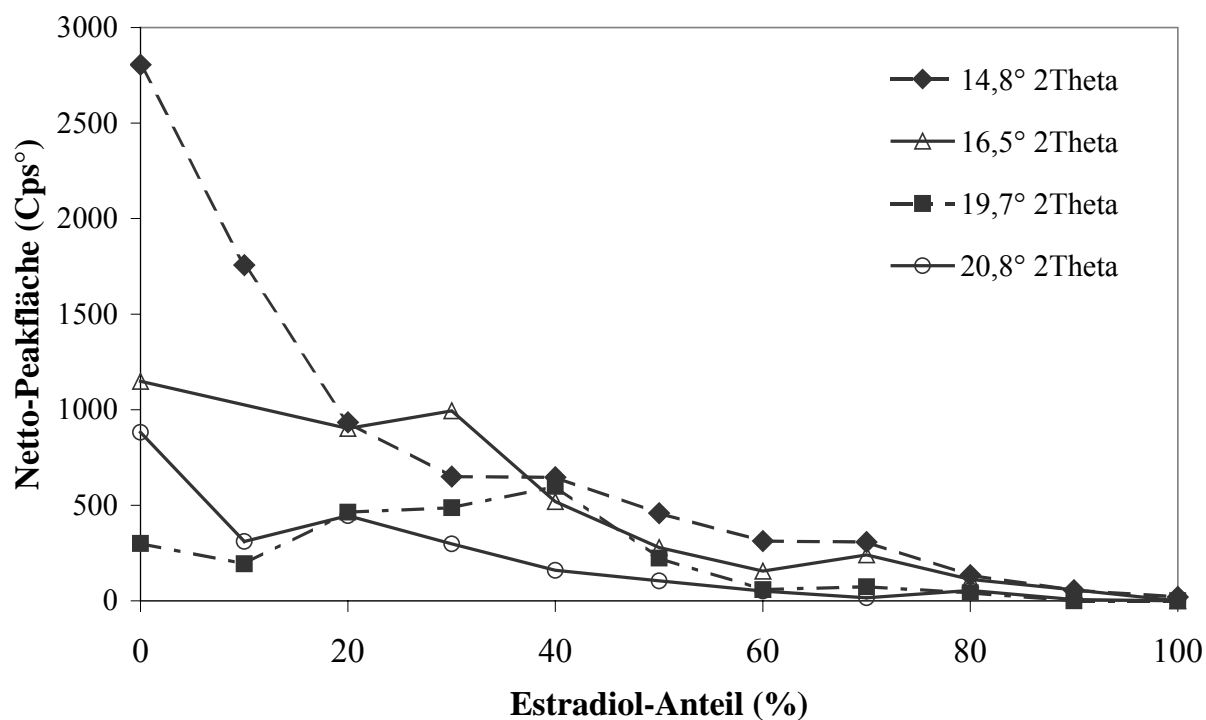


Abb. 7.7. Reflexintensitäten der NEA-Reflexe in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Wirkstoffmischung (auskristallisiert aus Ethylacetat).

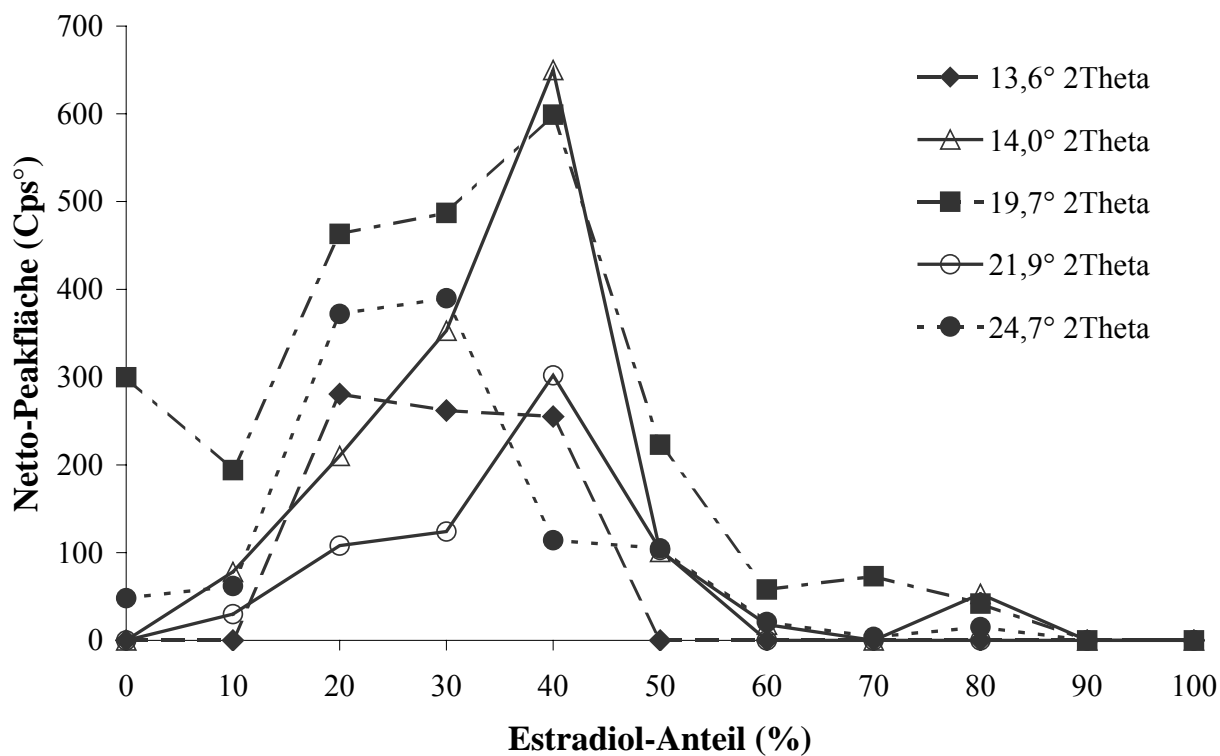


Abb. 7.8. Reflexintensitäten der neu auftretenden Reflexe in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Wirkstoffmischung (auskristallisiert aus Ethylacetat).

Die zusätzlichen Reflexe erschienen vor allem im Konzentrationsbereich von 20 bis 40 % E2-hemihydrat in der kristallisierten Mischung (Abb. 7.8). Die Kombination der Hormone führte also verglichen mit den Ausgangssubstanzen zur Bildung von mindestens einer neuen Kristallstruktur. Die verschiedenen Peaks, die mittels DSC-Messung detektiert werden konnten (Tab. 7.3), stellen wahrscheinlich größtenteils Phasenumwandlungen beim Erhitzen dar. Bei dem DSC-Peak bei 145°C kann es sich um eine eutektische Mischung handeln, da trotz der neuen Phase weiterhin beide Reflexmuster getrennt voneinander vorliegen. Die zusätzlichen Reflexe im Bereich von 20 bis 40 % E2-Anteil könnten mit dem DSC-Peakmaximum bei 127°C assoziiert sein, das genau in diesem Konzentrationsbereich auftritt, aber nur eine sehr geringe Wärme freigibt.

Die charakteristischen Reflexe der Arzneistoffe wurden bestimmt, um diese für die quantitative Auswertung der Kristallmengen im TTS anzuwenden. Es war notwendig, Reflexe auszuwählen, die nicht mit den neuen Kristallphasen interferieren, wie z.B. der NEA-Reflex bei  $19,7^\circ 2\theta$ , der in einigen Mischungen trotz abnehmendem NEA-Gehalt anstieg. Anhand der Abb. 7.6 und Abb. 7.7 wurden also für E2-hemihydrat und NEA typische Reflexe bei  $13,1^\circ 2\theta$ ,  $15,7^\circ 2\theta$  und  $26,5^\circ 2\theta$  bzw. bei  $14,8^\circ 2\theta$ ,  $16,5^\circ 2\theta$  und  $20,8^\circ 2\theta$  ausgewählt. Diese zeigen eine hohe Intensität und damit verbundene Empfindlichkeit sowie eine lineare Abhängigkeit von der enthaltenen Arzneistofffraktion, um eine Quantifizierung der gebildeten Kristalle in den TTS-Laminaten zu ermöglichen.

Die Reflexe der kristallisierten Wirkstoffmischungen sind gut reproduzierbar. Alle Reflexe treten wieder auf, allerdings beobachtet man geringe Schwankungen in der Reflexintensität zwischen den einzelnen Messungen, was auf Textureffekte bei der Probenvorbereitung zurückzuführen sein könnte. Besonders für den E2-Reflex bei  $13,1^\circ 2\theta$  wurden Abweichungen in der Intensität gefunden. Auch in den wirkstoffhaltigen TTS zeigt dieser Reflex während der Alterung zum Teil starke Schwankungen. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um einen Übergangszustand auf dem Weg zu einem stabilen Kristallgitter handelt.

## 8 Untersuchung der Placebo-Systeme

### 8.1 Pulverröntgenbeugung

#### 8.1.1 TTS PLA 0

Ein reines Durotak<sup>®</sup>-Laminat (TTS PLA 0) zeigt eine hohe amorphe Streuung der Röntgenstrahlen und damit eine hohe Untergrundintensität über den gesamten Messbereich. Auch nach Lagerung treten keine Röntgeninterferenzen auf. Nur der Trägerfolienreflex bei  $21,3^\circ 2\theta$  erscheint im Diagramm (Abb. 8.1). Die polymere Matrix ist demnach auch nach Alterung amorph, was polarisationsmikroskopisch bestätigt wurde.

Allerdings tritt teilweise ein kleiner, breiter Reflex bei  $23,5^\circ 2\theta$  auf. Dieser Reflex scheint den häufigsten Abstand der Polymerelemente in der Vorzugsorientierung zu charakterisieren und stellt damit den Ansatz einer flüssigkristallinen Phase dar.

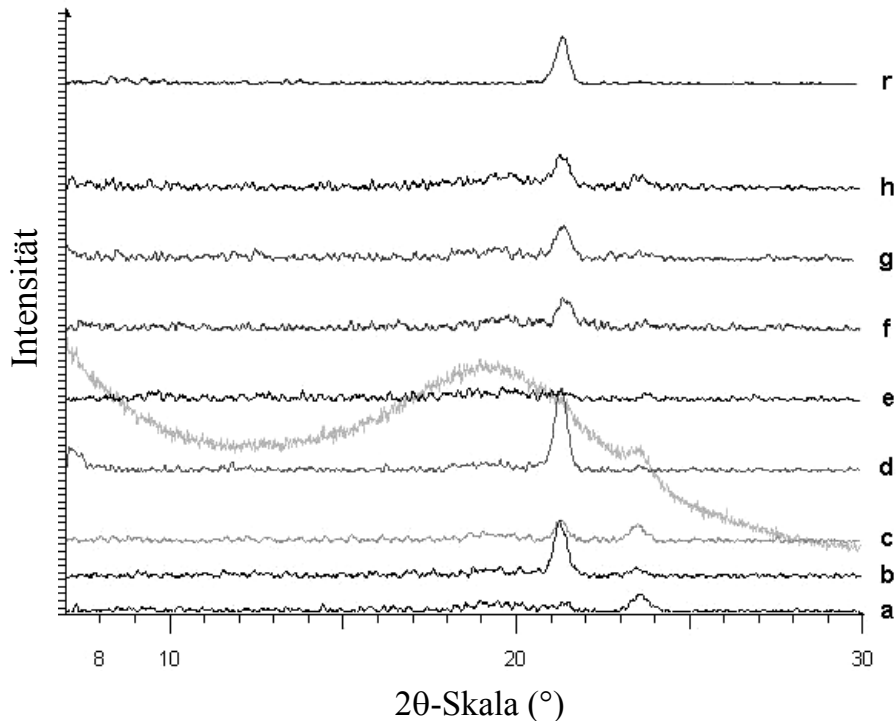


Abb. 8.1. Röntgendiagramm des TTS PLA 0 nach Lagerung bei Raumtemperatur: (a) 0 Tage, (b) 1 Woche, (c) 2 Wochen, (d) 4 Wochen, (e) 6 Wochen, (f) 8 Wochen, (g) 3 Monate, (h) 4 Monate, (r) Probenhalterfolie.



### 8.1.2 TTS PLA 1

Das TTS PLA 1 stellt die Standardmatrix der untersuchten wirkstoffhaltigen TTS-Lamine dar. Es liegt, wie das reine Polymer Durotak® 387-2287 (TTS PLA 0), während der Alterung amorph vor (Abb. 8.2) und zeigt den typischen Röntgenreflex der Trägerfolie bei  $21,3^\circ 2\theta$  sowie den breiten Reflex bei  $23,5^\circ 2\theta$ , der wiederum auf die Vorzugsorientierung der Moleküle und deren häufigsten Abstand im Polymer hindeutet. Der Folienreflex zeigt kein kontinuierliches Wachstum, sondern ein spontanes Auftreten in Abhängigkeit von der Spannkraft im Probenhalter.

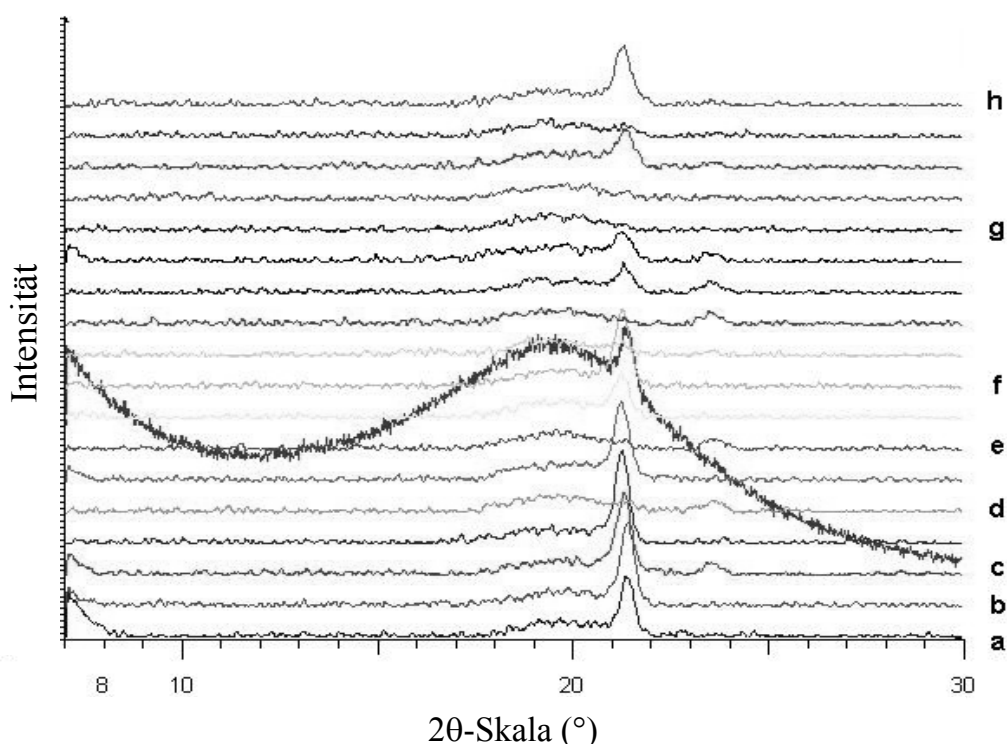


Abb. 8.2. Röntgendiagramm des TTS PLA 1 nach Lagerung bei Raumtemperatur: (a) 0 Tage, (b) 1 Woche, (c) 2 Wochen, (d) 4 Wochen, (e) 6 Wochen, (f) 8 Wochen, (g) 3 Monate und (h) 4 Monate. Reflex der Probenhalterfolie bei  $21,3^\circ 2\theta$ .

## 8.2 Mikrokalorimetrie

Die von der Kristallisation der Wirkstoffe stammende Wärmeentwicklung in wirkstoffhaltigen TTS-Laminaten kann durch Wärmefluss signale überlagert werden, die auf Wechselwirkungen zwischen Hilfsstoffen beruhen. Deshalb wurden die Placebo-TTS mikrokalorimetrisch untersucht.

Sie zeigten einen starken initialen Wärmefluss zu Beginn der Messung, der über die Messzeit von 7 Tagen langsam zu einem geringen exothermen Wärmefluss abfällt. Das reine Durotak<sup>®</sup>-Polymer sowie das Mannitol- und die PEG 400-haltigen Systeme geben über 7 Tage eine annähernd gleiche Wärmemenge ab (Abb. 8.3). Nur das Eutanol G- sowie das Glycerin-haltige Placebo entwickeln eine im Vergleich zu den anderen Systemen geringere Wärme während der Messzeit.

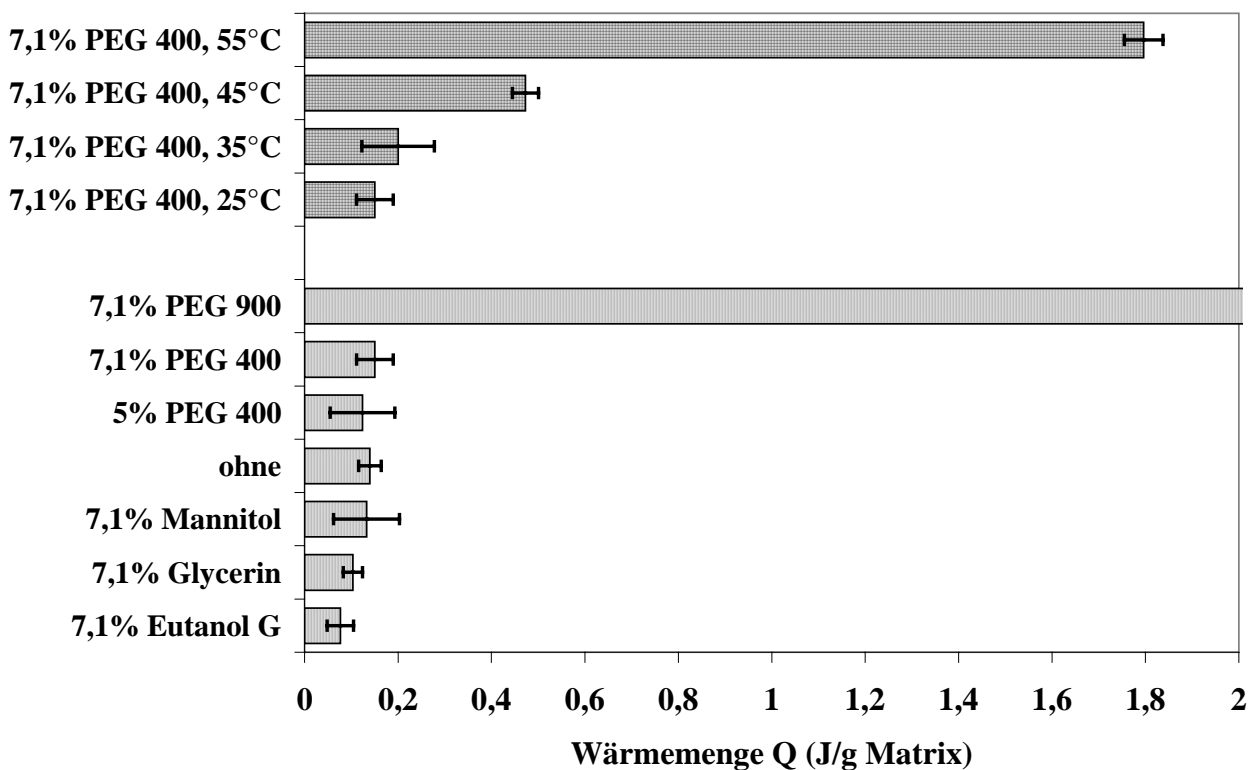


Abb. 8.3. Vergleich der berechneten Wärmemenge über 7 Tage für verschiedene Polymer-Systeme ohne und mit Zusatzstoffen bei 25°C bzw. des TTS PLA 1 bei erhöhten Temperaturen.

Der registrierte Wärmefluss der Placebo-Systeme kann nicht auf Kristallisationsvorgänge zurückgeführt werden, da mithilfe der Pulverröntgenbeugung und Polarisationsmikroskopie nachgewiesen wurde, dass die Matrix auch nach Zugabe von PEG 400 bei der Lagerung amorph vorliegt (Abb. 8.1 und Abb. 8.2). Als Ursache für den Wärmefluss können Effekte durch die mechanische Beanspruchung des Ausstanzens, Diffusionsvorgänge der Moleküle innerhalb des Polymers sowie Wechselwirkungen zwischen den Hilfsstoffen angenommen werden.

Fügt man dem Polymer dagegen PEG 900 mit einem Schmelzpunkt von 32 bis 35°C hinzu, so kristallisiert dieses im Gegensatz zu den anderen Hilfsstoffen während der Lagerung bei 25°C aus. Die Kristallisation wird von einer wesentlich höheren Wärmeabgabe im Vergleich zu den anderen Placebo-Systemen begleitet (Abb. 8.3).

Zersetzungsreaktionen sowie Diffusionsvorgänge verlaufen bei erhöhter Temperatur beschleunigt. Eine Temperaturerhöhung erhöht folglich den Wärmefluss der Placebo-Systeme (Abb. 8.3), wobei ein überproportionaler Zusammenhang gefunden wurde. Bei 55°C zeigte das TTS PLA 1 etwa die 10-fache Wärmefreigabe im Vergleich zu 25°C, was vermutlich auf eine erhöhte Diffusion im Polymer zurückzuführen ist.

### **8.3 DSC-Analytik**

In der DSC-Kurve eines reinen Durotak-TTS (TTS PLA 0) ohne Arzneistoff war bei 161°C ein Phasenübergang zu erkennen (Abb. 8.4). Ein TTS PLA 1, bestehend aus Durotak® 387-2287 mit 7,1 % PEG 400 als Weichmacher, zeigte eine Absenkung dieser Phasenübergangstemperatur auf 89°C.

Bei dem registrierten Phasenübergang handelt es sich vermutlich nicht um den Glasübergang der Polymere, da in diesem Fall eine Kristallisation der inkorporierten Arzneistoffe wegen der Starrheit der Matrix bei Raumtemperatur unwahrscheinlich wäre. Zudem besäßen die Lamine keine ausreichenden Klebeeigenschaften für die Applikation auf der Haut. Es handelt sich bei den registrierten Phasenübergängen möglicherweise um den Übergang vom festen zum flüssigen Polymer.

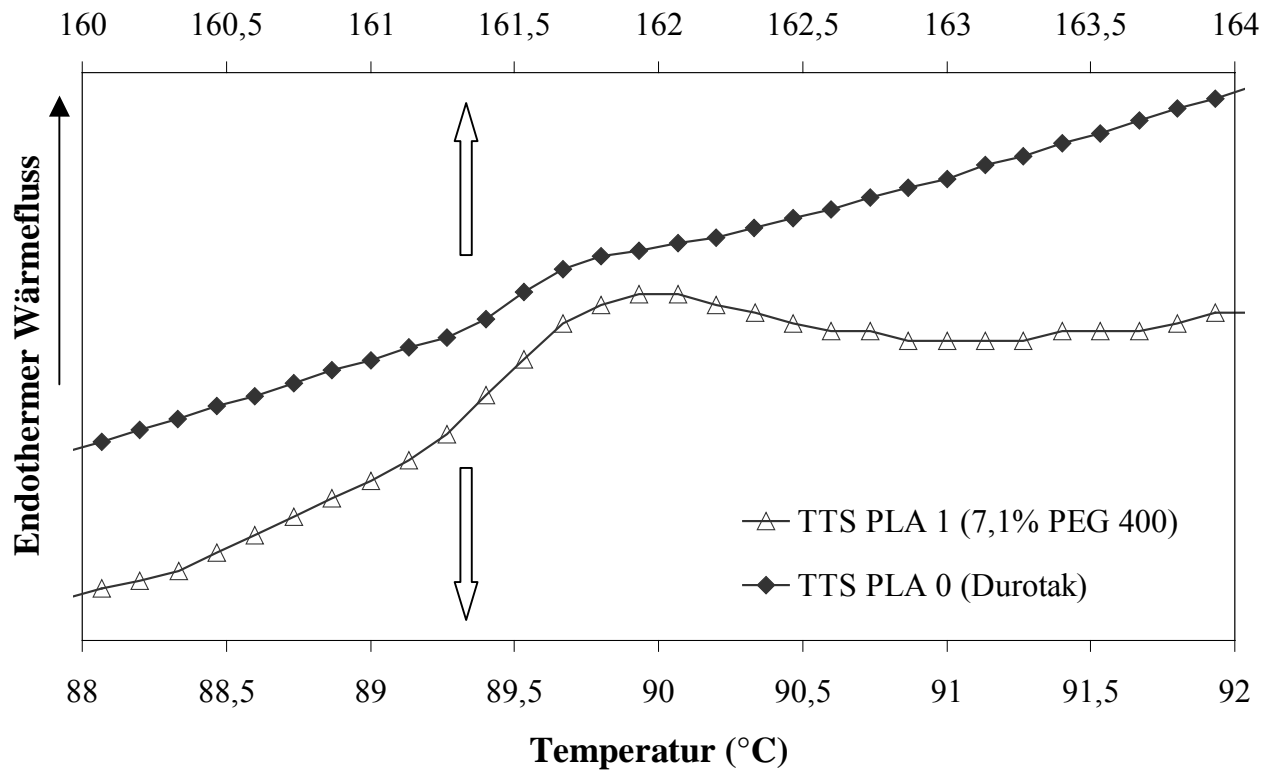


Abb. 8.4. DSC-Kurven der Placebo-Systeme nach 2-monatiger Lagerung bei Raumtemperatur (Scanningrate: 10°C/min).

## 9 Kristallisation von Estradiol-haltigen TTS

### 9.1 Polarisationsmikroskopie

Die E2-haltigen TTS-Lamine waren direkt nach der Herstellung amorph und völlig kristallfrei. Die Kristallisation in den übersättigten TTS-Matrizes wurde sowohl mit dem Auge als auch mithilfe der Polarisationsmikroskopie nach ein paar Tagen oder erst nach einigen Wochen Lagerung bei Raumtemperatur sichtbar (Abb. 9.1). Der Kristallisationsbeginn war von der Arzneistoffkonzentration abhängig und die Zeit bis zur Keimbildung nahm, wie erwartet, mit höherem E2-Gehalt ab, während die Kristallmenge dementsprechend anstieg. Die Kristalldichte nahm während der Lagerzeit stark zu. Weil in den 1,5 % E2-haltigen Laminen nach einjähriger Lagerzeit nur wenige Kristalle mikroskopisch beobachtet werden konnten, ist anzunehmen, dass die Sättigungskonzentration der polymeren Matrix für E2-hemihydrat bei ungefähr 1,5 % liegt.

Bei niedrigen Konzentrationen bildet E2-hemihydrat vor allem prismatische oder quaderförmige Kristalle (Abb. 9.1a-b), während bei höheren Konzentrationen Nadeln entstehen (Abb. 9.1c-f). Bei den höchsten verwendeten Konzentrationen lagerten sich diese Nadeln zu Büscheln zusammen (Abb. 9.1e-f), wobei zusätzlich auch prismatische Kristallformen vorhanden waren.

Die Arbeit von Variankaval et al. (1999) unterschied ebenfalls verschiedene Kristallformen von Estradiol in transdermalen Pflastern durch IR-Messungen. Sie nahmen an, dass die Nadeln das Ergebnis einer Cokristallisation von Estradiol mit der polymeren Matrix darstellen.

### 9.2 Pulverröntgenbeugung

Bei der vorliegenden Untersuchung zeigten die in der polymeren Matrix während der Lagerung gebildeten nadelförmigen Kristalle jedoch das gleiche Röntgenbeugungsmuster wie das reine, mikronisierte E2-hemihydrat (Abb. 9.2). Es ist also anzunehmen, dass der Arzneistoff das gleiche Kristallgitter bildet, ungeachtet der Tatsache, ob er in der adhäsiven

Matrix oder aus einem Lösungsmittel auskristallisiert. In der polymeren Matrix ist das Wachstum der stabilsten physikalischen Form des E2-hemihydrats bevorzugt (Needham et al. 1992, Lipp & Müller-Fahrnow 1999).

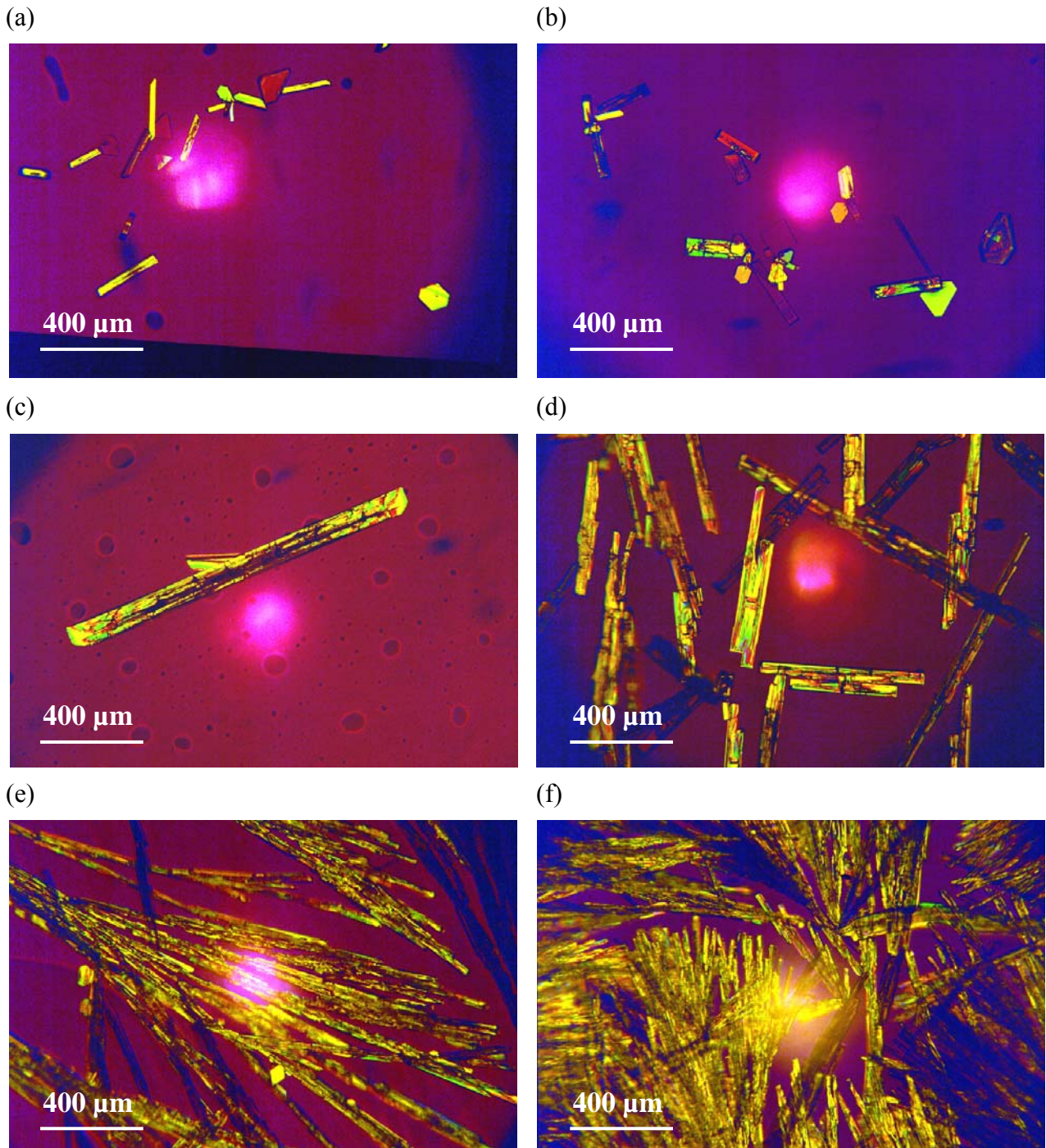


Abb. 9.1. Polarisationsmikroskopie von E2-haltigen TTS mit steigendem E2-hemihydrat-Gehalt nach Lagerung bei Raumtemperatur: (a) 1,5 %, 6 Monate, (b) 2 %, 3 Monate, (c) 3 %, 8 Wochen, (d) 4 %, 8 Wochen, (e) 5 %, 8 Wochen, (f) 6 %, 8 Wochen.

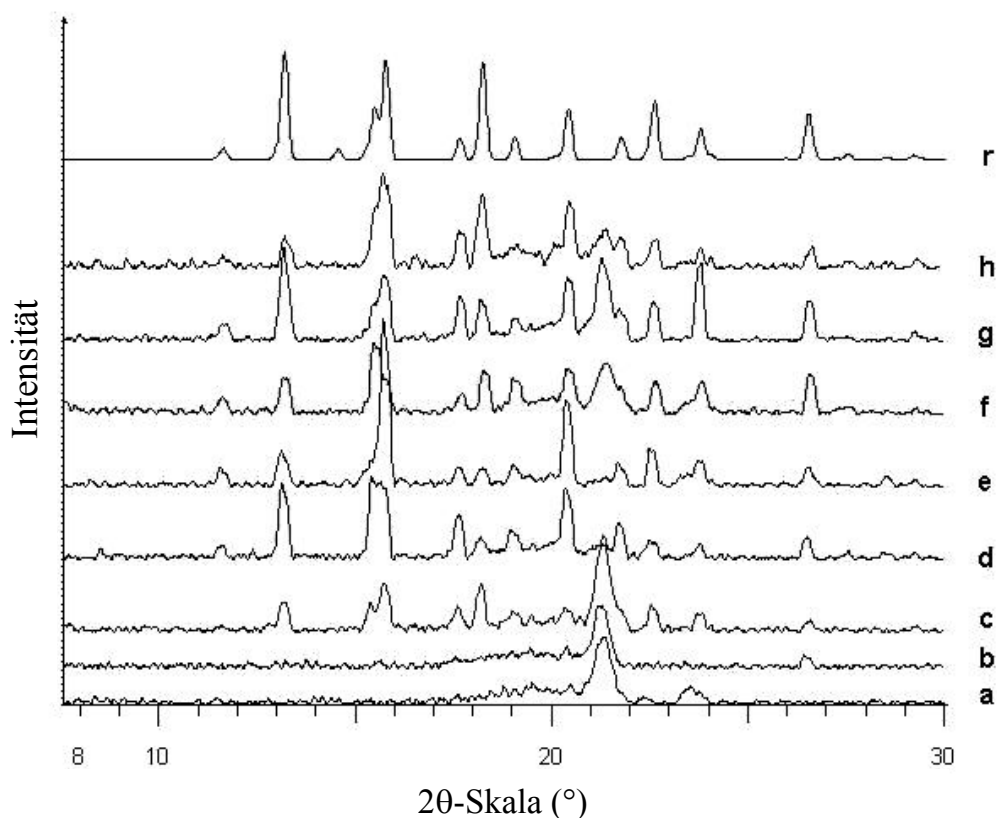


Abb. 9.2. Röntgendiagramm eines 6 % E2-hemihydrat enthaltenden TTS nach Lagerung bei Raumtemperatur: (a) 0 Tage, (b) 1 Woche, (c) 2 Wochen, (d) 4 Wochen, (e) 6 Wochen, (f) 8 Wochen, (g) 3 Monate, (h) 4 Monate, (r) E2-hemihydrat als Referenz. Der Reflex bei  $21,3^\circ$   $2\theta$  ist durch die Probenhalterfolie begründet.

Für die nadelförmigen Kristalle konnte kein Einfluss der Matrix auf die Kristallstruktur gefunden werden, denn wenn das Polymer in die Kristalle eingebaut würde, so müssten sich das Kristallgitter und damit auch die Reflexpositionen signifikant verändern. Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch durch die Untersuchungen von Iervolino et al. (2001) erhalten, die beschrieben haben, dass Hydroxypropylmethylcellulose-Moleküle wegen der Unvereinbarkeit in ihrer Größe nicht in Ibuprofenkristalle eingeschlossen werden können. Wegen der vergleichsweise geringen Empfindlichkeit der Pulverröntgenbeugung bei der Detektion geringer Kristallmengen in der amorphen Matrix war es nicht möglich, den prismatischen Kristallen ein eigenes Reflexmuster zuzuordnen, da diese nur in sehr geringer Anzahl vorkamen. TTS-Laminate, die 1,5 % bzw. 2 % E2-hemihydrat enthielten, erschienen im Beugungsmuster vollständig amorph, auch wenn einige prismatische oder quaderförmige

Kristalle mikroskopisch nach 3 bis 4 Wochen bzw. schon nach einer Woche Lagerung erkennbar waren. Eine prismatische Morphologie ist bei Estradiol-Kristallen sowohl für die wasserfreie Form (Variankaval et al. 2000) als auch für E2-hemihydrat beschrieben (Kuhnert-Brandstätter & Grimm 1968, Kuhnert-Brandstätter & Winkler 1976), wobei sich aber die Kristallform innerhalb der polymeren Matrix durch die Bindung von Makromolekülen an die Kristallseiten über Wasserstoffbrückenbindung verändern kann. Wenn die Adsorption der Zusatzstoffe an alle Kristalloberflächen gleich ist, so ist die Wachstumshemmung gleichmäßig und die Kristallgestalt wird nicht verändert (Iervolino et al. 2001). Ist das Ausmaß der Adsorption an die verschiedenen Kristallseiten aber unterschiedlich, dann ändert sich die Kristallmorphologie, weil die Kristallform durch die langsamste wachsende Kristallfläche bestimmt wird (Raghavan et al. 2001a). Die Morphologie hängt von der relativen Wachstumsrate der verschiedenen kristallographischen Oberflächen ab.

Die Röntgenbeugung ermöglichte ab einer Gesamtarzneistoffkonzentration von 3 % die Detektion von Kristallen in den TTS-Laminaten. Da aber bereits bei einer Konzentration von 1,5 % E2-hemihydrat Kristalle im Polarisationsmikroskop nachweisbar waren und eine Sättigungskonzentration von etwa 1,5 % in der Matrix angenommen wurde, kann man davon ausgehen, dass das Detektionslimit der Pulverröntgenbeugung für Kristallinität innerhalb der amorphen Matrix wesentlich niedriger liegt, als von einer Reihe von Autoren angenommen wurde (Leuner & Dressman 2000), nämlich bei 1,5 % Kristallinität relativ zu der Gesamtmasse des Laminates aus Polymer und Arzneistoff (Lehto & Laine 1998).

Die Abb. 9.2a bis h zeigt das Kristallisationsverhalten einer Charge eines 6 % E2-haltigen Laminates bei Raumtemperatur. Das Reflexmuster war gut reproduzierbar, wenn verschiedene Bereiche desselben Laminates zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessen wurden, aber die Reflexintensitäten schwankten in Abhängigkeit vom Kristallisationsgrad des Ausschnittes, da nur eine sehr geringe Fläche von ca. 1 cm<sup>2</sup> gemessen werden konnte. Zu Kristallisationsbeginn existierten größere Intensitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Proben, als wenn die Pflaster vollständig kristallisiert vorlagen. Die Kristallisation ist ein willkürlicher Prozess, sodass das Kristallisationsverhalten innerhalb der Polymermatrix in verschiedenen Bereichen des Laminates nicht vollständig gleich ist. Kristallisierte Bereiche können sich mit kristallfreien abwechseln. Die



Intensitätsschwankungen lassen sich auf eine ungleichmäßige Verteilung der Kristalle in den gemessenen Proben zurückführen.

Während die Mikroskopie keine quantitative Bestimmung der gebildeten Kristalle erlaubt, ist es mithilfe der Pulverröntgenbeugung möglich, halbquantitativ die Kristallmenge in der amorphen Matrix auf der Basis von ansteigenden Reflexintensitäten während der Alterung zu bestimmen (Fukuoka et al. 1989). Die typischen Reflexe für E2-hemihydrat bei  $13,1^\circ 2\theta$ ,  $15,7^\circ 2\theta$  und  $26,5^\circ 2\theta$  wurden dazu verwendet.

Die Reflexflächen stiegen mit der Lagerzeit kontinuierlich bis zur Beendigung der Kristallisation an (Abb. 9.3). Der Kristallisationsprozess schien bei niedrigen Konzentrationen langsamer abzulaufen, denn das Peakmaximum wurde nach längerer Lagerdauer erreicht. Keimbildung und Kristallwachstum waren bei hohen Arzneistoffkonzentration beschleunigt, was durch das raschere Erreichen des Kristallisationsendes verfolgt werden konnte. TTS-Lamine mit einem Gehalt von  $\geq 6\%$  E2-hemihydrat erreichten das Peakflächenmaximum bereits nach einer kurzen Zeit von 2 bis 4 Wochen (Abb. 9.3). Für Konzentrationen  $\leq 4\%$  erfolgte ein fast linearer Anstieg der Reflexflächen, wobei ein stabiler Zustand erst nach 3 oder mehr Monaten erreicht wurde.

Fast alle Lamine, außer dem 8 %igen Pflaster, zeigten für einige Wochen nach der Herstellung eine Kristallisationshemmung. Erst nach dieser Zeit wurden röntgendiffraktometrisch detektierbare Kristalle gebildet. Zieht man in Betracht, dass die Detektionsgrenze der Pulverröntgenbeugung bei 1,5 % Kristallinität liegt, so müssten gering übersättigte Lamine fast vollständig kristallisiert vorliegen, um im Beugungsmuster Reflexe auftreten zu lassen. Bei starker Übersättigung wurde dieses Limit schneller erreicht. Aber auch die Induktionszeit, das heißt die Zeit, die benötigt wurde, um Kristallkeime von kritischer Größe zu bilden, bevor das Kristallwachstum beginnen kann, nahm mit steigendem Grad der Sättigung ab (Iervolino et al. 2001, Raghavan et al. 2001a).

Da die Netto-Reflexflächen in Abb. 9.3 bei der Alterung starken Schwankungen unterlagen, was auf der zufälligen Verteilung der Kristallkeime in der Matrix beruhte, wurde die folgende Auswertung der Messdaten durchgeführt. Durch die Anpassung von logarithmischen bzw. linearen Funktionen an die Messwerte wurde die theoretische Netto-Peakfläche nach 13 Wochen Lagerung berechnet und in Abhängigkeit vom E2-Gehalt

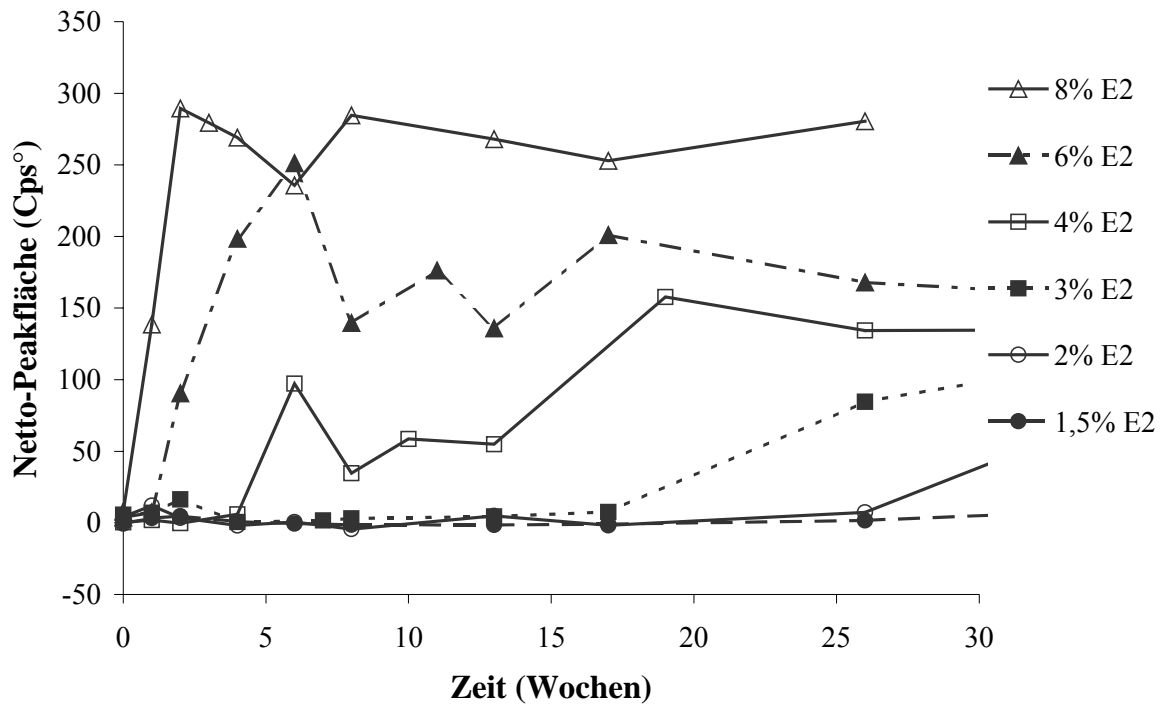


Abb. 9.3. Netto-Peakflächen der Pulverröntgenbeugung für den charakteristische Reflex des E2-hemihydrat bei  $15,7^\circ 2\theta$  in Abhängigkeit von der E2-Konzentration in den Pflastern sowie der Lagerzeit bei Raumtemperatur. Normierung auf ein konstantes Flächengewicht von  $100 \text{ g/m}^2$ .

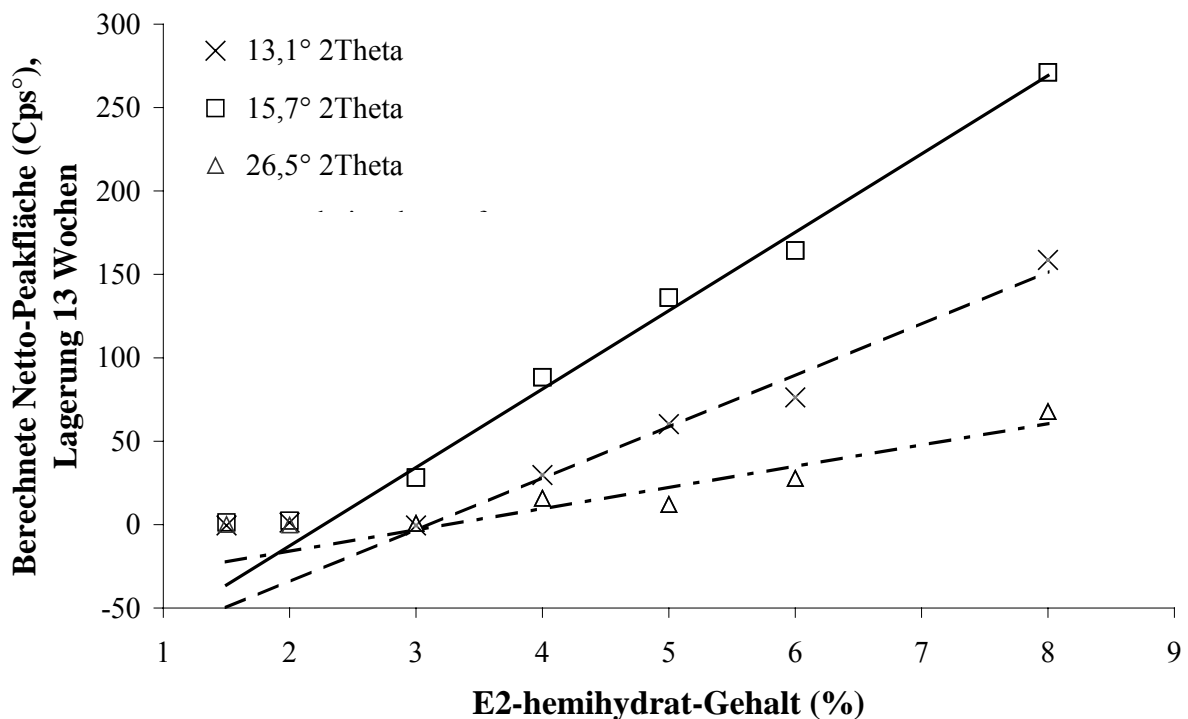


Abb. 9.4. Abhängigkeit der berechneten Netto-Peakfläche nach 13 Wochen Lagerung bei Raumtemperatur in Abhängigkeit vom E2-hemihydrat-Gehalt. Konzentrationen ohne messbare Kristallisation sind nicht in die Korrelation einbezogen.

dargestellt (Abb. 9.4). Zwischen der Netto-Peakfläche der E2-Reflexe und der Konzentration wurde mit steigendem E2-Gehalt oberhalb einer Konzentration von 2 % eine lineare Korrelation erhalten. Der Schnittpunkt mit der Abszisse lag zwischen 2 und 3 % E2-hemihydrat und entspricht der Sättigungskonzentration aus der Röntgenbeugung. Die mittels Pulverröntgenbeugung bestimmte Sättigungskonzentration lag damit höher als die aus der Mikroskopie, was auf die geringere Empfindlichkeit der Methode zurückzuführen war (Detektionsgrenze von 1,5 %).

### 9.3 Mikrokolorimetrie

Die Ergebnisse aus der Polarisationsmikroskopie wurden durch die isotherme Wärmeleitungsmikrokolorimetrie bestätigt. Der Arzneistoff-immanente Wärmefluss stieg mit steigendem E2-Gehalt infolge der verstärkten Kristallisation an (Abb. 9.5). Während ein Gehalt von 1,5 % E2-hemihydrat noch keinen messbaren Arzneistoff-immanenten Wärmefluss lieferte, wurde für die 2 %igen Lamine ein minimaler Fluss von 0,1  $\mu\text{W/g}$  Matrix beobachtet. Die Mikrokolorimetrie scheint also für die Bestimmung von Kristallisationsvorgängen in polymeren Matrices eine gute Empfindlichkeit zu besitzen. Sogar die Bildung prismatischer Kristalle war durch einen Wärmefluss messbar. Trotzdem ist die Mikroskopie empfindlicher und spezifischer als die Mikrokolorimetrie, denn für die 1,5 %igen TTS wurden mikroskopisch nach 3 bis 4 Wochen die ersten Kristalle detektiert, wohingegen kein Arzneistoff-immanenter Wärmefluss gemessen werden konnte.

Die mikrokolorimetrischen Daten lassen auf eine Sättigungskonzentration zwischen 1,5 % und 2 % E2-hemihydrat in der polymeren Matrix schließen. Dieses Ergebnis entspricht einer geringfügig niedrigeren Empfindlichkeit der Mikrokolorimetrie im Vergleich zur Mikroskopie, aber einer höheren Empfindlichkeit als die Pulverröntgenbeugung.

Trotz der höheren Detektionsgrenze des Mikrokolorimeters werden Kristallisationsprozesse ab 2 % E2-hemihydrat schneller erkannt als dies mithilfe der Polarisationsmikroskopie möglich ist. Schon nach einem Tag im Mikrokolorimeter können Instabilitäten erkannt werden. Mikroskopisch wurden die Kristalle dagegen erst nach einer oder mehreren Wochen sichtbar. Wenn allerdings kein messbarer Wärmefluss durch die Probe entsteht, so

werden weitergehende Untersuchungen zum Ausschluss von Kristallisations- oder Zersetzungsprozessen notwendig.

Der Arzneistoff-immanente Wärmefluss von E2-hemihydrat beruht ausschließlich auf Kristallisationsvorgängen, weil keine signifikante chemische Zersetzung über ein Jahr messbar war (siehe Kap. 13.2).

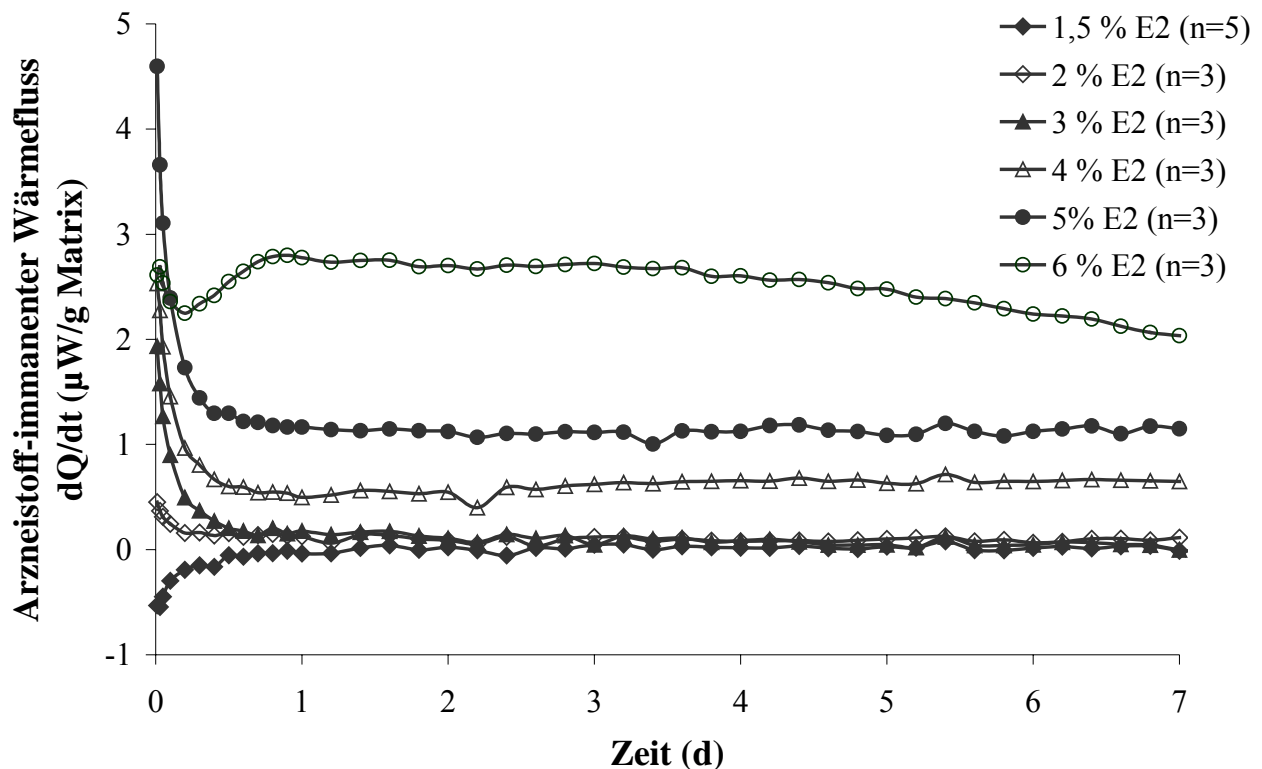


Abb. 9.5. Konzentrationsabhängiger Arzneistoff-immanenter Wärmefluss von E2-hemihydrat-haltigen TTS bei 25°C.

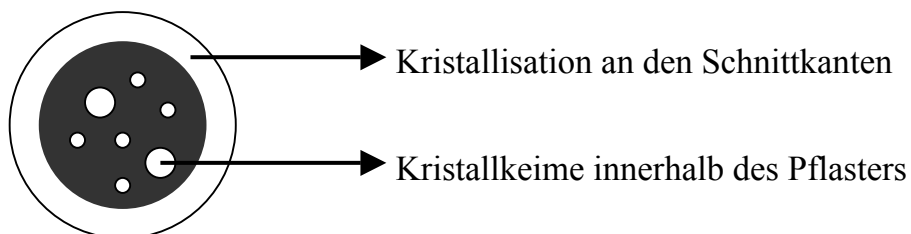


Abb. 9.6. Kristallisationsprozesse in ausgestanzten Laminaten.

Für die mikrokalorimetrische Untersuchung wurden runde Scheiben des Durchmessers 10 mm mit einem Stanzwerkzeug ausgestanzt. Die Kristallisation der Lamine war an den Schnittkanten verstärkt, was seine Ursache in der starken Scherkraft durch das Ausstanzen hat (Stefano et al. 1997). Die mikroskopische Untersuchung ergab, dass in Bereichen starker mechanischer Kraft, wie z.B. Schnittkanten, die Kristallisation ausgeprägter abläuft (Abb. 9.6), was in einem höheren initialen Wärmefluss resultiert. Die Kristallkeime, die sich während des Ausstanzprozesses gebildet hatten, wuchsen schnell ins Pflasterinnere. Sie zeigten das stärkste Wachstum und damit verbunden auch den höchsten Wärmefluss direkt nach dem Ausstanzen. Die Kristallisationsgeschwindigkeit und damit auch der Arzneistoff-immanente Wärmefluss nahmen im weiteren Verlauf ab (Abb. 9.5).

Die 6 %igen TTS-Lamine zeigten ein breites Wärmeflussmaximum zum Zeitpunkt  $t = 1 \text{ d}$  (Abb. 9.5). Die hohe Übersättigung fördert die Kristallkeimbildung und das anschließende Kristallwachstum, wobei die starke Bildung von Kristallkeimen im Inneren des Pflasters als dieses separate Maximum sichtbar wurde (Abb. 9.6). Je mehr Keimbildung im Inneren stattfand und je mehr Wärme dadurch während des ersten Messtages frei wurde, desto höher war das Maximum. Bei niedrigen Arzneistoffkonzentrationen mit fehlender oder nur geringer Kristallkeimbildung im Inneren verschwand dieses Maximum unter dem kontinuierlich abfallenden Wärmefluss.

Für Lamine mit steigendem Arzneistoffgehalt ergeben sich in Übereinstimmung mit den mikroskopischen Bildern und den Röntgenuntersuchungen eine ansteigende Arzneistoff-immanente Wärmemenge sowie ein erhöhter Arzneistoff-immanenter initialer Wärmefluss (Abb. 9.7). Dieser Anstieg war überproportional zum E2-Gehalt der Pflaster. Theoretisch sollte zwischen dem Arzneistoffgehalt und der entwickelten Wärme oberhalb der Sättigungskonzentration der polymeren Matrix eine lineare Korrelation bestehen, weil eine gleichmäßig ansteigende Menge des Arzneistoffüberschusses auskristallisieren sollte. Diese Linearität wurde über die Messzeit von 7 Tagen nicht beobachtet, da der Kristallisationsvorgang innerhalb dieser vergleichsweise kurzen Zeit noch nicht abgeschlossen war.

Die Kristallisation verlief mit steigendem Arzneistoffgehalt beschleunigt und war dadurch auch schneller beendet, da Kristallkeimbildung und Kristallwachstum mit steigender Übersättigung verstärkt waren (Rodríguez-Hornedo & Wu 1991, Kubota et al. 1997,

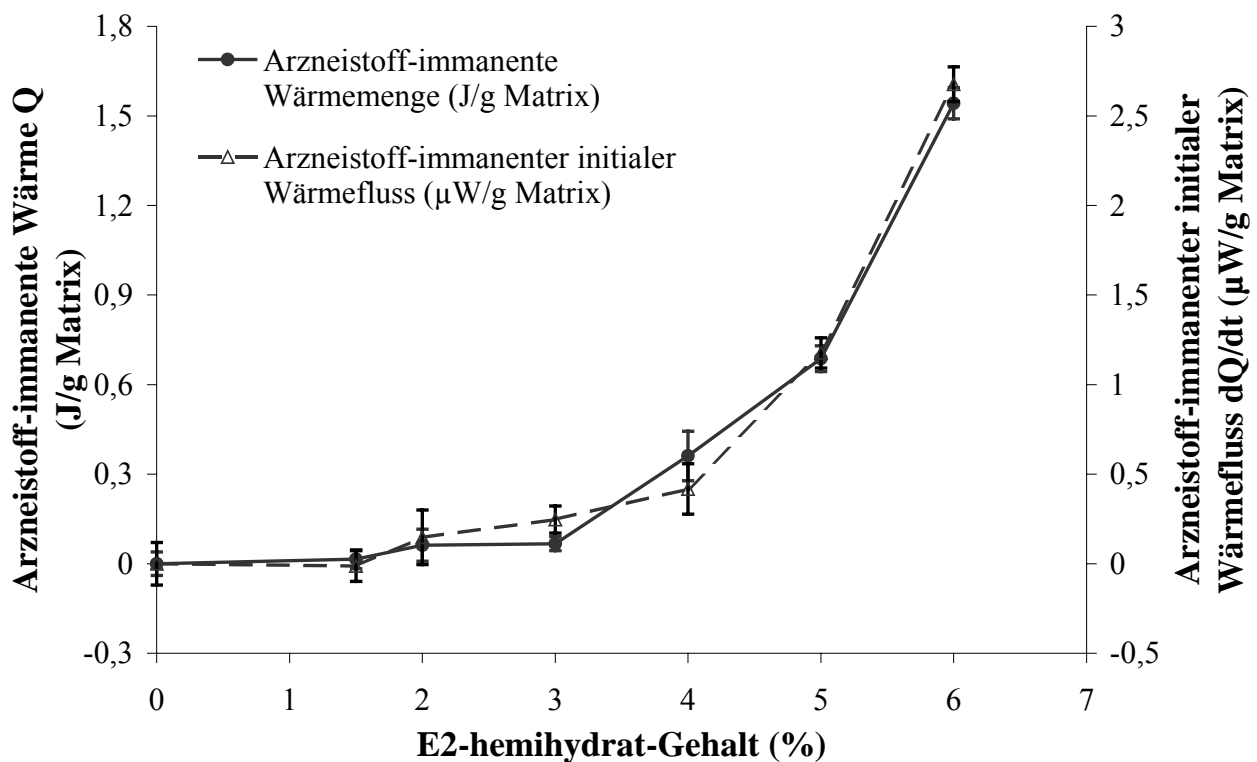


Abb. 9.7. Korrelation zwischen der berechneten Arzneistoff-immanenten Wärmemenge  $Q$  über 7 Tage und dem initialen Wärmefluss in Abhängigkeit vom E2-hemihydrat-Gehalt (25°C).

Rodríguez-Hornedo & Murphy 1999, Schmelzer et al. 1999). Innerhalb von 7 Tagen entstand deshalb in Systemen mit höherem Arzneistoffgehalt und damit verbundener stärkerer Übersättigung entsprechend der erhöhten Kristallisationsgeschwindigkeit eine größere Wärmemenge. Diese Tatsache kann den überproportionalen Anstieg von Wärmemenge  $Q$  und initialem Wärmefluss  $dQ/dt$  in Abb. 9.7 erklären.

Die Hypothese der linearen Korrelation zwischen Arzneistoffkonzentration und Wärmemenge nach Kristallisationsende wurde durch mikrokolorimetrische Messungen von übersättigten Laminaten über 35 Tage bestätigt. Der Arzneistoff-immanente Wärmefluss sank während dieser Messzeit auf 0  $\mu\text{W/g}$  (Abb. 9.8). Nur das 4 % E2-haltige Laminat zeigte nach 35 Tagen Zeit noch einen Wärmefluss von 0,3  $\mu\text{W/g}$ . Bei einer längeren Messzeit würde sich die Genauigkeit allerdings nicht erhöhen, da bereits geringe Schwankungen der Basislinie das Ergebnis beeinflussen würden. Basislinienschwankungen können über diesen langen Zeitraum von einigen Wochen nicht rechnerisch korrigiert werden, da die Schwankungen nicht linear sind.

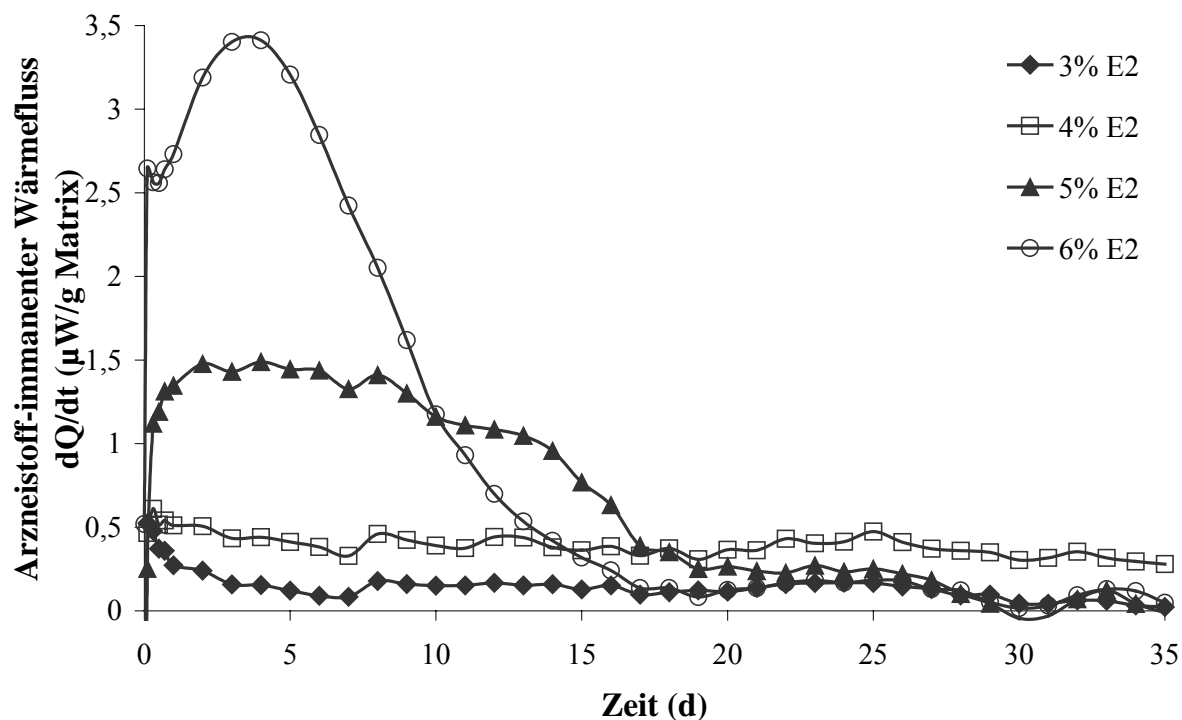


Abb. 9.8. Arzneistoff-immanente Wärme Flüsse bei der Langzeitmessung von E2-hemihydrat-haltigen TTS bei 25°C.

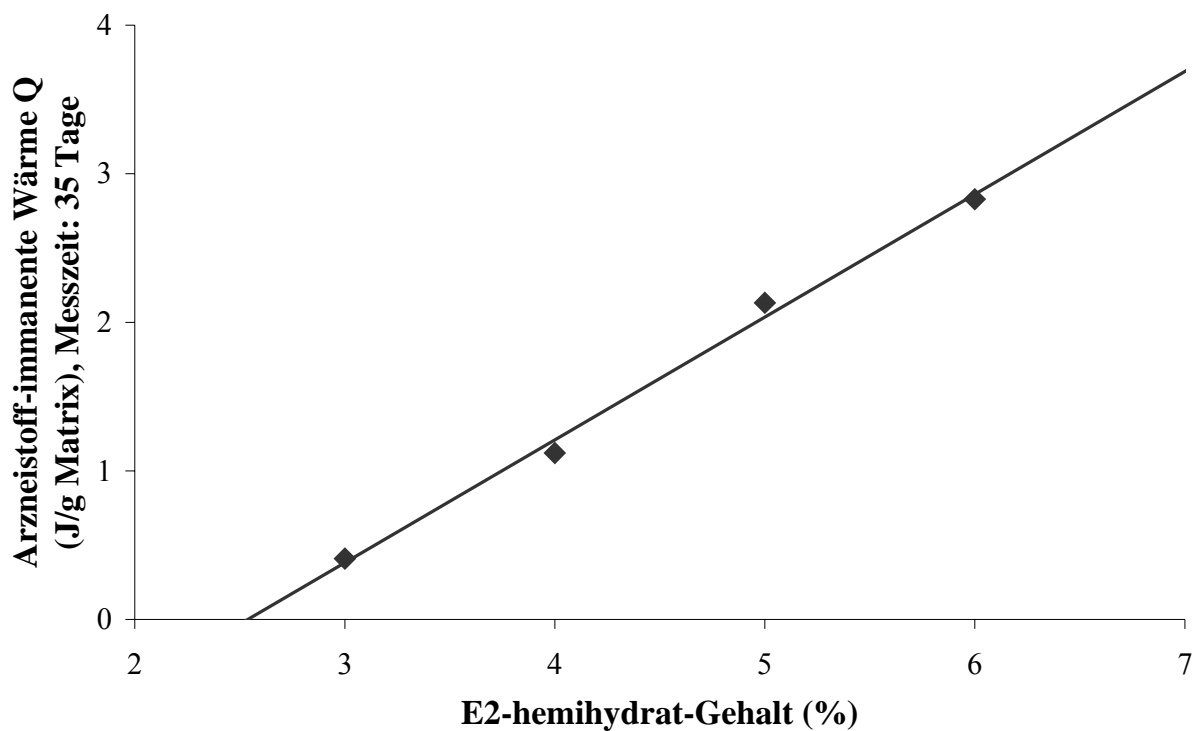


Abb. 9.9. Lineare Korrelation zwischen Arzneistoff-immanenter Wärme in Abhängigkeit vom E2-Gehalt über eine Messzeit von 35 Tagen bei 25°C.

Trotzdem bestand ein linearer Zusammenhang zwischen dem E2-hemihydrat-Gehalt und der gemessenen Wärmemenge (Abb. 9.9). Die Steigung der Gerade stellt die Kristallisationsenthalpie von E2-hemihydrat in der polymeren Matrix mit 7,1 % PEG 400 dar und betrug  $-23,3 \pm 1,2$  kJ/mol.

Die Kristallisation begann mit der Bildung von kleinen Kristallkeimen. Diese waren mittels Pulverröntgenbeugung nicht detektierbar, führten aber zu hohen Wärmeflussignalen, die im Mikrokalorimeter gut zu verfolgen waren. Die Pulverröntgenbeugung besaß keine ausreichende Empfindlichkeit, wenn nur geringe kristalline Anteile im Polymer vorhanden waren (Detektionsgrenze von 1,5 %). Trotzdem erlaubten die Reflexflächen-Zeit-Kurven die Extrapolation auf die theoretische Netto-Peakfläche der Reflexe nach einwöchiger Lagerung. Durch Vergleich dieses Wertes mit der Arzneistoff-immanenten Wärme über 7 Tage ergab sich eine schwache lineare Korrelation (Abb. 9.10). Beide Methoden schienen den Prozess der Kristallisation zu erfassen, aber ihre Empfindlichkeit, Genauigkeit und der Kristallisationsbeginn unterschieden sich stark.

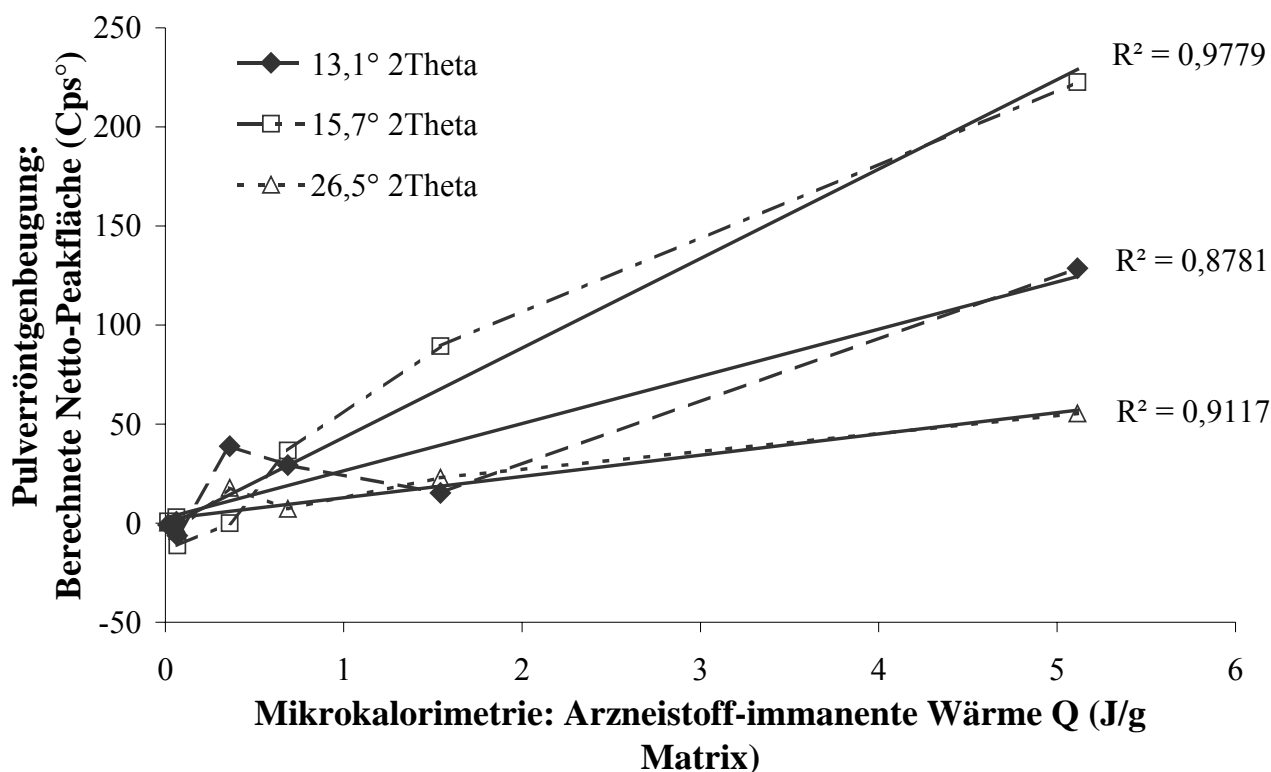


Abb. 9.10. Abhängigkeit der berechneten Netto-Peakfläche aus der Pulverröntgenbeugung nach einwöchiger Lagerung bei Raumtemperatur von der über diesen Zeitraum detektierten Wärmemenge der E2-haltigen TTS.



## 9.4 HPLC-Bestimmung der Sättigungslöslichkeit

Neben den bereits beschriebenen Methoden wurde die Sättigungslöslichkeit auch mithilfe der HPLC untersucht. Dazu wurden Zweischichtsysteme hergestellt, bei denen eine mit E2-hemihydrat übersättigte Matrix und eine zu Beginn arzneistofffreie Matrix über eine semipermeable Membran verbunden waren (Kap. 6.2.2.3). Nach einer Lagerung von 2 Monaten, in denen sich ein Konzentrationsgleichgewicht einstellte, wurde die Sättigungskonzentration der anfänglich wirkstofffreien Matrix HPLC-analytisch untersucht. Mit dieser Technik konnte unter Verwendung von 6 %igen Laminaten für E2-hemihydrat eine Sättigungslöslichkeit von 0,6 % im Pflaster bestimmt werden, wohingegen die 4 %igen bzw. 5 %igen Systeme eine durchschnittliche Löslichkeit von 1,65 % ergaben (Tab. 9.1). Das 6 %ige Laminat kristallisierte sehr schnell. Dadurch konnte der Arzneistoff nicht mehr in die zweite, ursprünglich arzneistofffreie Schicht diffundieren. Bei dem 4 %igen bzw. 5 %igen System hingegen blieb der übersättigte Zustand für eine relativ lange Zeit erhalten.

E2-hemihydrat-Gehalt bei Herstellung	E2-hemihydrat-Gehalt der Placebo-Schicht nach Lagerung
4 %	1,7 %
5 %	1,6 %
6 %	0,6 %

Tab. 9.1. HPLC-analytische Bestimmung der Sättigungskonzentration von E2-hemihydrat nach einer Lagerzeit von 2 Monaten bei Raumtemperatur.

Es gibt zwei verschiedene Methoden, um die Sättigungslöslichkeit zu bestimmen, die Auflösung eines Überschusses an kristallinem Arzneistoff in einer ungesättigten Lösung unter Lösungsbedingungen oder die Kristallisation von übersättigten Lösungen. Die zweite Methode führt im Allgemeinen zu höheren Werten  $C$  als die wahre Löslichkeit  $C_{\text{sat}}$  im Lösungsgleichgewicht (Darcy & Wiencek 1998). Die resultierende relative Übersättigung  $(C - C_{\text{sat}})/C_{\text{sat}}$  entspricht einem Faktor von 1,5 bis 2 und wird als „tote Zone“ bezeichnet. Der beobachtete Unterschied zwischen 0,6 % und 1,65 % ergibt eine relative Übersättigung von

1,75 und liegt damit in den angegebenen Grenzen des Faktors der „toten Zone“ zwischen 1,5 und 2. Weil sich die Löslichkeit von 0,6 % für E2-hemihydrat in der Polymermatrix der Pflaster auch bei längerer Lagerzeit nicht änderte, kann dieser Wert als wahre Löslichkeit angenommen werden. Die Löslichkeit unter Kristallisationsbedingungen steht mit 1,65 % in guter Übereinstimmung mit den Werten aus Mikroskopie und Mikrokalorimetrie.

## 9.5 Kristallisationskinetik

Die Mikrokalorimetrie ermöglicht die Bestimmung von kinetischen Parametern, wie z.B. der Reaktionsordnung und der Geschwindigkeitskonstante (Angberg & Nyström 1988, Hansen et al. 1989, Koenigbauer 1994, Willson et al. 1995, Lehto & Laine 1998, Selzer et al. 1998), sowohl für chemische Reaktionen als auch für Kristallisationsvorgänge. Die Kristallisationskinetik wird durch die Johnson-Mehl-Avrami-Gleichung (Gl. 43) beschrieben. Im Folgenden soll versucht werden, die JMA-Kinetik auf die gemessenen mikrokalorimetrischen Daten zu übertragen. Dafür wird angenommen, dass die Wärmeproduktion proportional zur Menge an rekristallisiertem Arzneistoff ist. Um die kristallisierte Fraktion  $x(t)$  für E2-hemihydrat zum Zeitpunkt  $t$  aus der gemessenen Wärmemenge  $Q(t)$  berechnen zu können, wurden die Werte von 1,5 % als geringste mikroskopisch bestimmte Sättigungslöslichkeit (nachgewiesener Kristallisationsbeginn) und 82,6 J/g als Kristallisationsenthalpie verwendet. Abb. 9.11 zeigt die kristallisierte Fraktion als Funktion von der Zeit. Durch die mit steigender Übersättigung beschleunigte Kristallisation besitzen Lamine mit höherem Arzneistoffgehalt einen höheren Kristallisationsgrad.

In Abb. 9.12 wurde die kristallisierte Fraktion als linearer Ausdruck der JMA-Gleichung gegen die Zeit aufgetragen. Diese lineare Avrami-Korrelation Gl. 44 ermöglicht die Berechnung der durchschnittlichen Geschwindigkeitskonstante  $k$  sowie des Avrami-Exponenten  $n$  für das Zeitintervall 1 bis 7 Tage (Tab. 9.2).

E2-hemihydrat zeigte ein eindimensionales, nadelförmiges Kristallwachstum und das lange Tailing der mikrokalorimetrischen Kurven spricht für ein diffusionskontrolliertes Wachstum in der hochviskosen Polymermatrix (Abb. 5.3b). Der erwartete Avrami-Exponent  $n$  hätte

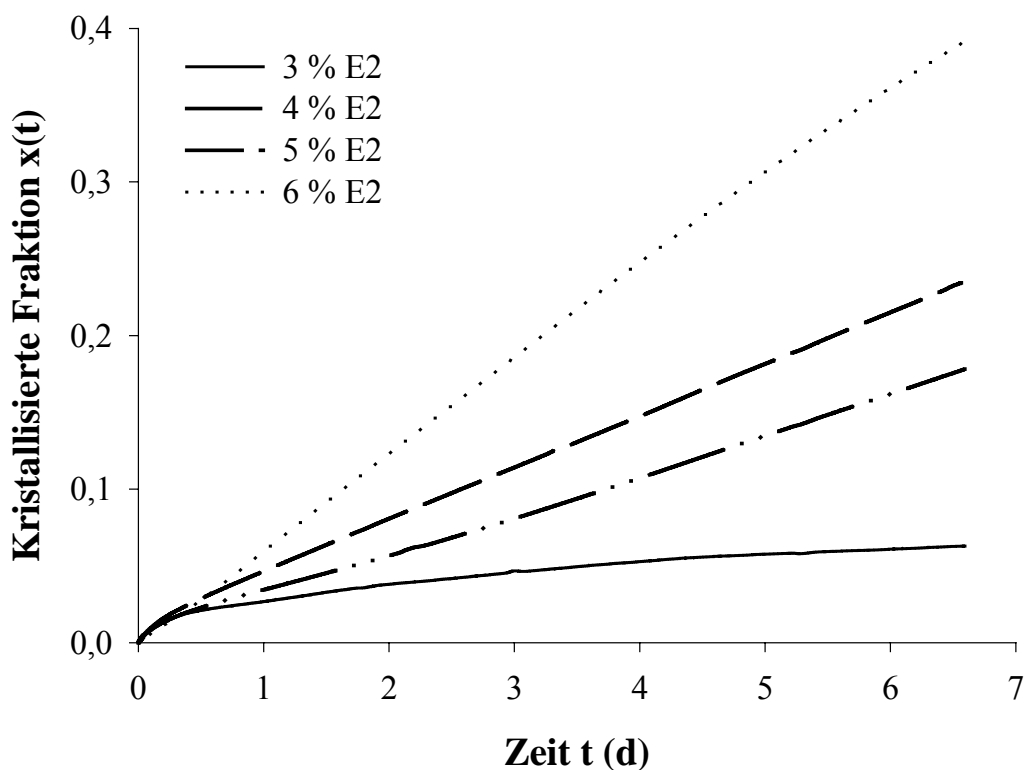


Abb. 9.11. Abhängigkeit der berechneten kristallisierten Fraktion der E2-haltigen TTS von der Zeit (Kristallisationsenthalpie: 82,6 J/g, Sättigungslöslichkeit: 1,5 % E2-hemihydrat).

folglich in Abhängigkeit von der Art der Kristallkeimbildung eine Größe von 0,5 bzw. 1,5 (Pradell et al. 1998). Lamine mit geringer Übersättigung, wie die 3 %igen Systeme, zeigten außer den durch Ausstanzen initiierten Kristallkeimen keine zusätzliche Keimbildung im Pflasterinneren, sodass der Avrami-Exponent mit 0,46 dem theoretischen Wert für eine gesättigte Keimbildung entspricht. Erhöhte man die Übersättigung der Systeme, so fand eine verstärkte Keimbildung während der Messung statt, die mit einer Erhöhung des Avrami-Exponenten einhergeht. Für eine kontinuierliche Keimbildung wird ein Wert von 1,5 erwartet. Dieser theoretische Wert wurde nicht erreicht, da durch den Ausstanzvorgang die initial vorhandenen Kristallkeime eine entscheidende Rolle spielten. Ihr Einfluss nahm jedoch durch die Verlangsamung des Kristallwachstums im Verlauf der Kristallisation ab, während die neuen Kristallkeime an Gewicht gewannen. So erhöhte sich der Avrami-Exponent mit steigendem Kristallisationsgrad sowie bei erhöhter Übersättigung auf einen Wert von 1,1.

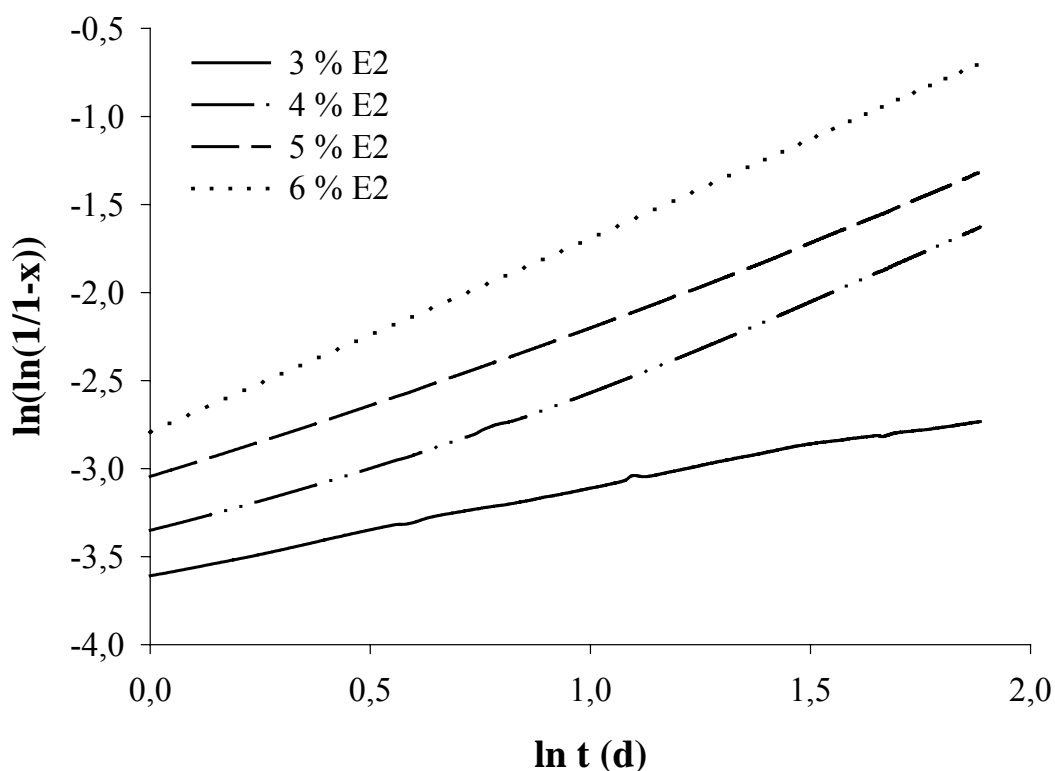


Abb. 9.12. Klassische doppelt-logarithmische Auftragung der Avrami-Gleichung der E2-Kristallisation in TTS.

E2-Gehalt (%)	Übersättigung	Avrami-Exponent n	k (1/d <sup>n</sup> )	k* (1/d)
3	1,0	0,4612	0,0280	0,0004
4	1,7	0,9656	0,0305	0,0269
5	2,3	0,9406	0,0442	0,0363
6	3,0	1,1137	0,0608	0,0809

Tab. 9.2. Durchschnittliche für die E2-Kristallisation bestimmte Avrami-Parameter für das Zeitintervall 1 bis 7 Tage.

Die Geschwindigkeitskonstante  $k^*$  zeigte einen nahezu linearen Anstieg mit steigendem Grad der Übersättigung (Abb. 9.13), was auf einen beschleunigten Kristallisationsprozess hinwies. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Ma et al. (1996), die bereits

beschrieben haben, dass die Kristallisationsgeschwindigkeit und die Anzahl der Kristalle mit steigendem Arzneistoffgehalt anstieg.

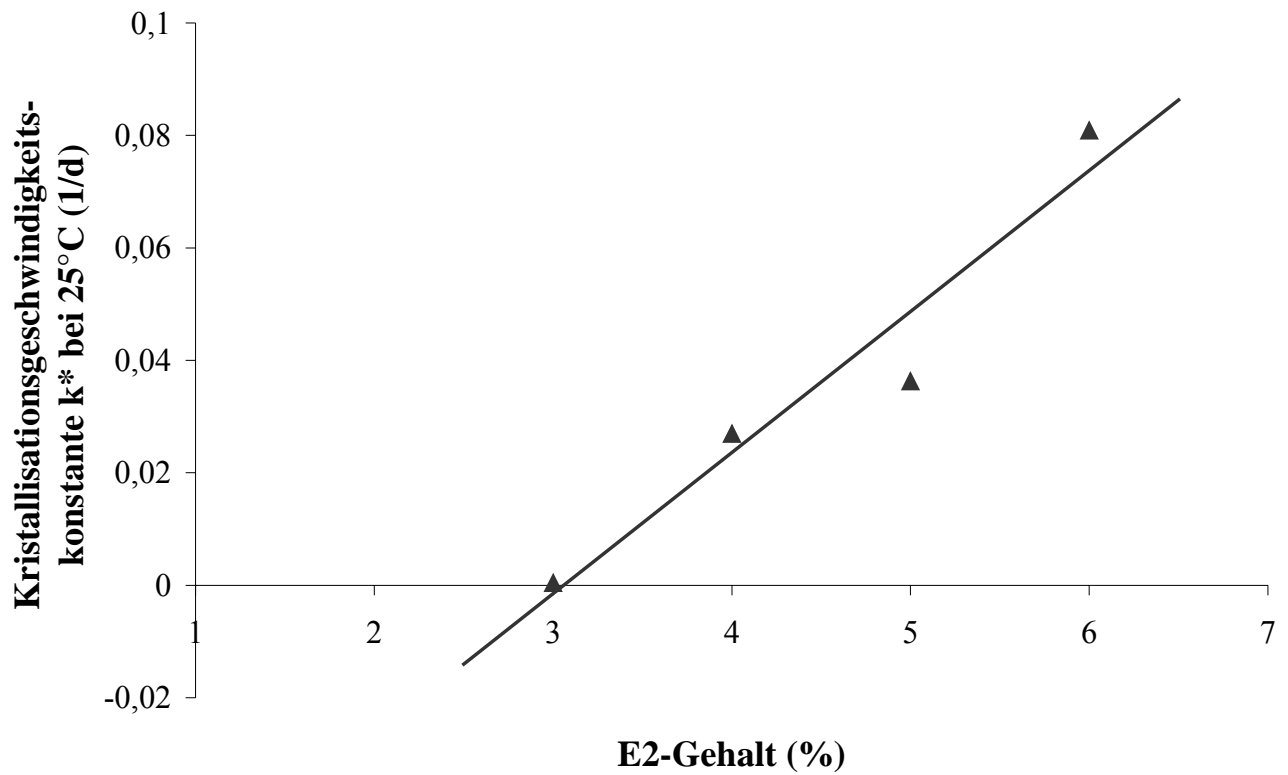


Abb. 9.13. Abhängigkeit der Kristallisationsgeschwindigkeitskonstante  $k^*$  nach Avrami vom E2-Gehalt in den TTS-Laminaten.

## 10 Kristallisation von NEA-haltigen TTS

### 10.1 Polarisationsmikroskopie

Die Kristallisation von amorphem Norethisteronacetat (NEA) in den TTS-Laminaten wurde bei Arzneistoffkonzentrationen im Bereich von 4 bis 12 % mithilfe der Polarisationsmikroskopie untersucht. Die Lamine waren direkt nach der Herstellung amorph und kristallfrei. Bereits nach einer kurzen Induktionszeit wurden Kristalle gebildet, die im Mikroskop beobachtet werden konnten. Die Induktionszeit war von der Arzneistoffkonzentration in den Pflastern abhängig und lag bei Raumtemperatur in einem Bereich von 5 Wochen für die Lamine mit einem Arzneistoffgehalt von 4 % NEA und nur einem Tag bei den 12 %igen Pflastern. Bei geringer Übersättigung waren die Induktionszeiten also deutlich verlängert, während steigende Arzneistoffmengen zu einer raschen Kristallbildung führten. Das Kristallwachstum erfolgte an diesen Kristallkeimen. Während der weiteren Lagerung wurde neben dem Kristallwachstum die Bildung von neuen Kristallisationspunkten beobachtet. Die Kristalldichte erhöhte sich durch die Kristallisationsvorgänge kontinuierlich und die entstehende Kristallmenge stieg mit der Arzneistoffkonzentration an (Abb. 10.1).

Die Lamine, die NEA in einer Konzentration von 2 % enthielten, zeigten kein Kristallwachstum in der polymeren Acrylatmatrix und blieben während der Lagerzeit von 12 Monaten amorph (Abb. 10.1a), wohingegen sich in den 4 %igen Laminaten während der gleichen Lagerzeit einige Kristalle bildeten (Abb. 10.1b). Entsprechend diesen Ergebnissen konnte die Sättigungslöslichkeit für NEA unter Kristallisationsbedingungen in der verwendeten PEG-haltigen Acrylatmatrix bei ungefähr 4 % angenommen werden.

Bei niedriger Übersättigung kristallisierte NEA stäbchenförmig aus, während sich bei hoher Übersättigung ein dendritisches Wachstum der Kristalle zeigte.

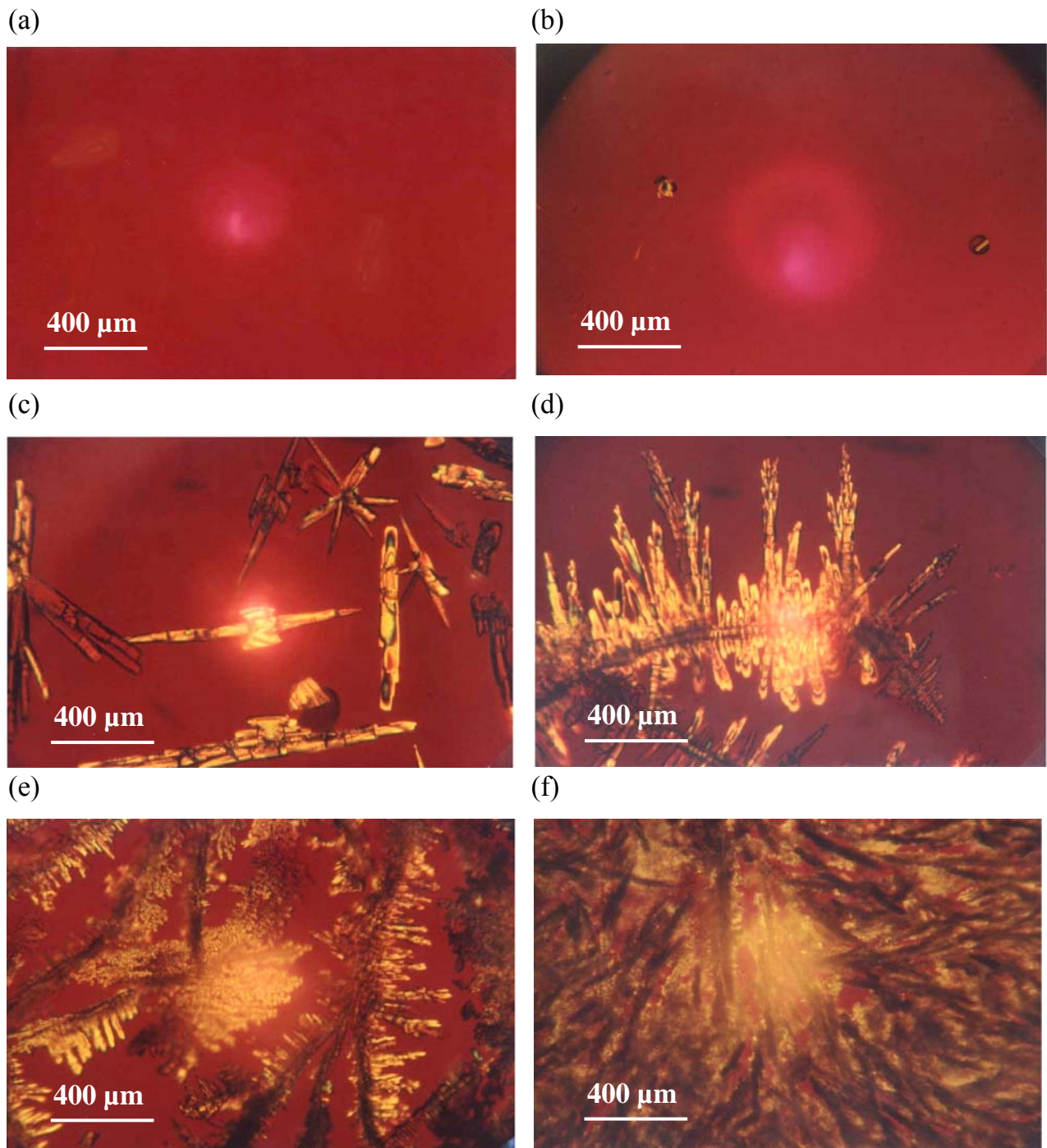


Abb. 10.1. Polarisationsmikroskopie von NEA-haltigen TTS mit steigender Arzneistoffkonzentration nach Lagerung bei Raumtemperatur: (a) 2 %, 12 Monate, (b) 4 %, 12 Monate, (c) 6 %, 8 Wochen, (d) 8 %, 8 Wochen, (e) 10 %, 8 Wochen, (f) 12 %, 1 Woche.

## 10.2 Pulverröntgenbeugung

Der Kristallisationsprozess bei Raumtemperatur wurde ebenfalls mittels Pulverröntgenbeugung untersucht. Direkt nach der Herstellung zeigte die transparente Matrix aller NEA-haltigen Systeme keine Reflexe, die durch kristalline Bereiche innerhalb der Matrix begründet waren. Der einzige messbare Peak erschien bei  $21,3^\circ 2\theta$  und war auf die Probenhalterfolie zurückzuführen.

Während der Lagerung einer Charge eines 10 %igen TTS-Laminates entstand ein in der Intensität ständig anwachsendes Reflexmuster, das auf der Arzneistoffkristallisation beruhte (Abb. 10.2), während die polymere Matrix amorph blieb. Das Röntgenbeugungsmuster der Kristallite zeigte charakteristische Reflexe bei  $14,8^\circ 2\theta$  (Triplet),  $16,5^\circ 2\theta$  und  $20,8^\circ 2\theta$  und entsprach vollständig dem des Ausgangsstoffs NEA. Das Polymer hatte keinen Einfluss auf die Kristallform.

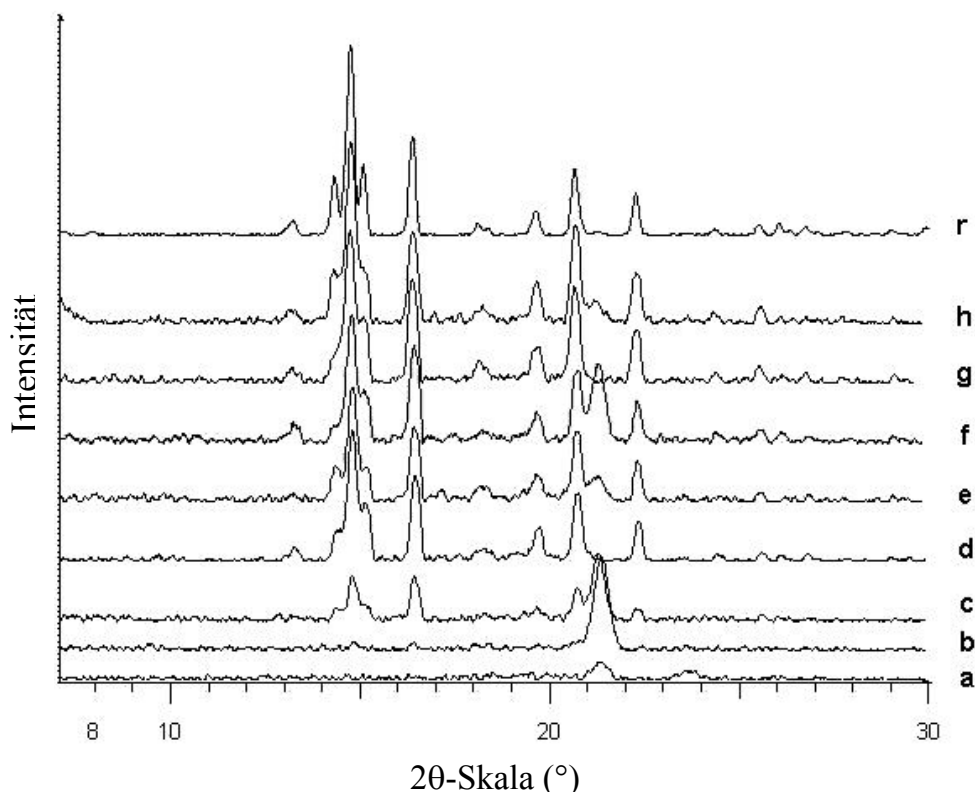


Abb. 10.2. Röntgendiagramm eines 10 %igen NEA-haltigen TTS nach Lagerung bei Raumtemperatur: (a) direkt nach Herstellung, (b) 1 Woche, (c) 2 Wochen, (d) 4 Wochen, (e) 6 Wochen, (f) 8 Wochen, (g) 3 Monate, (h) 4 Monate, (r) NEA als Referenz. Der Peak bei  $21,3^\circ 2\theta$  ist durch die Probenhalterfolie verursacht.



Das Kristallwachstum in der amorphen Matrix wurde mittels Pulverröntgenbeugung quantitativ ausgewertet. Die Auswertung basierte auf der Annahme, dass Veränderungen der Reflexflächen direkt proportional zur Kristallmenge in der Probe sind.

Die Zeit, bis erste Kristalle detektiert werden konnten, hing von der Empfindlichkeit der verwendeten Methode ab. Bei den 10 %igen Laminaten wurden erste Reflexe im Beugungsdiagramm nach 2 Wochen detektiert (Abb. 10.2), während die Mikroskopie bereits nach 3 Tagen kleine Kristallkeime zeigte. Der Beginn der Arzneistoffkristallisation, d.h. die Bildung von Kristallkeimen, konnte mithilfe der Pulverröntgenbeugung also nicht detektiert werden, denn die bei Kristallisationsbeginn gebildeten Kristallkeime besaßen nur eine geringe Anzahl von Molekülebenen im Gitter, durch die die Röntgenstrahlung gebeugt wurde. Dadurch entstanden nur sehr geringe Reflexintensitäten und breite Peaks, die unter dem hohen amorphen Untergrund verschwanden.

Die Reflexintensitäten stiegen mit steigender Lagerzeit entsprechend der höheren Kristallmenge in der Matrix kontinuierlich an, bis der Kristallisationsprozess beendet war (Abb. 10.3). Der Anstieg der Peakflächen war mit erhöhtem Arzneistoffgehalt größer.

Mithilfe der Pulverröntgenbeugung war ein Kristallwachstum nur bei Konzentrationen von  $\geq 8\%$  NEA in der Matrix zuverlässig detektierbar. Auch nach 6-monatiger Lagerung konnte keine Kristallbildung bei niedrigeren Konzentrationen nachgewiesen werden, obwohl die Kristallisation bei einem Gehalt von 4 % NEA im Mikroskop schon nach 5 Wochen zu beobachten war.

Es soll hier auch erwähnt werden, dass verschiedene Probenausschnitte des gleichen Laminates nach gleicher Lagerzeit verschiedene Peakintensitäten im Pulverdiagramm ergeben können. Dies ist dadurch begründet, dass der Keimbildungsprozess zufällig abläuft und die Kristalle nicht gleichmäßig über die Pflasterfläche verteilt vorliegen. Für die diffraktometrische Messung wird jedoch nur ein kleiner Ausschnitt verwendet, was zu Schwankungen in den Reflexintensitäten führt. Um den Fehler zu reduzieren, wurden an die Reflexflächen-Zeit-Kurven logarithmische bzw. lineare Ausgleichsfunktionen angelegt. Diese Funktionen dienen dazu, die theoretische Netto-Peakfläche nach 13 Wochen Lagerung zu berechnen (Abb. 10.4).

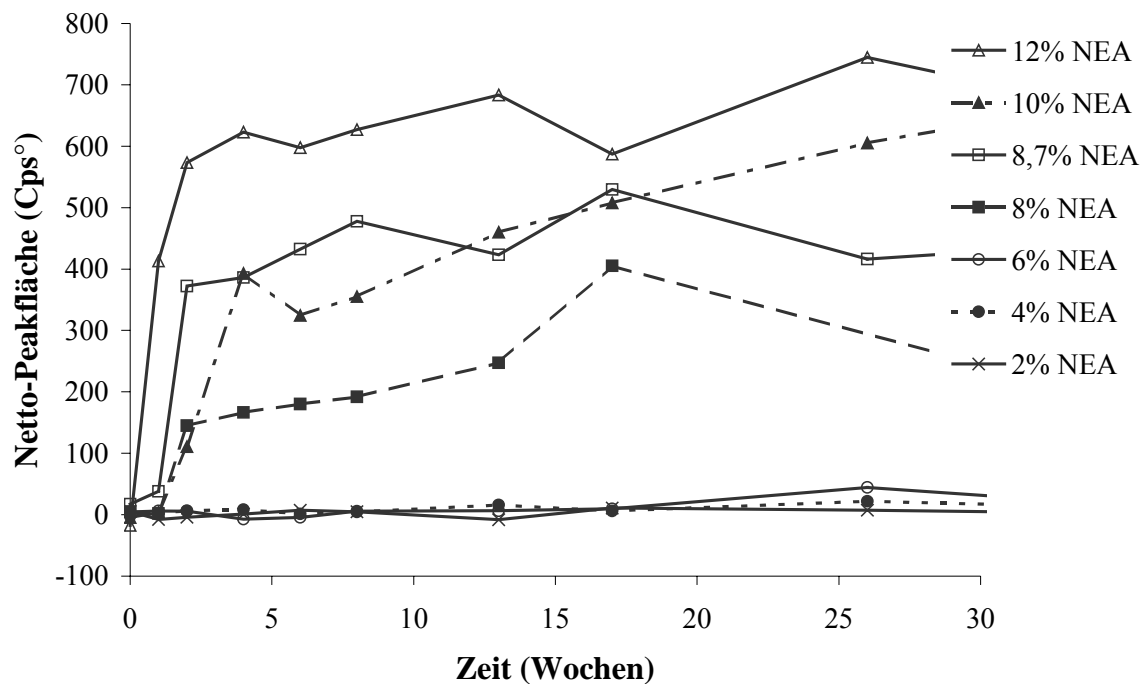


Abb. 10.3. Netto-Peakfläche für den charakteristischen NEA-Reflex bei  $14,8^\circ 2\theta$  in Abhängigkeit vom NEA-Gehalt der Laminate und der Lagerzeit bei Raumtemperatur. Normierung auf ein Flächengewicht von  $100 \text{ g/m}^2$ .

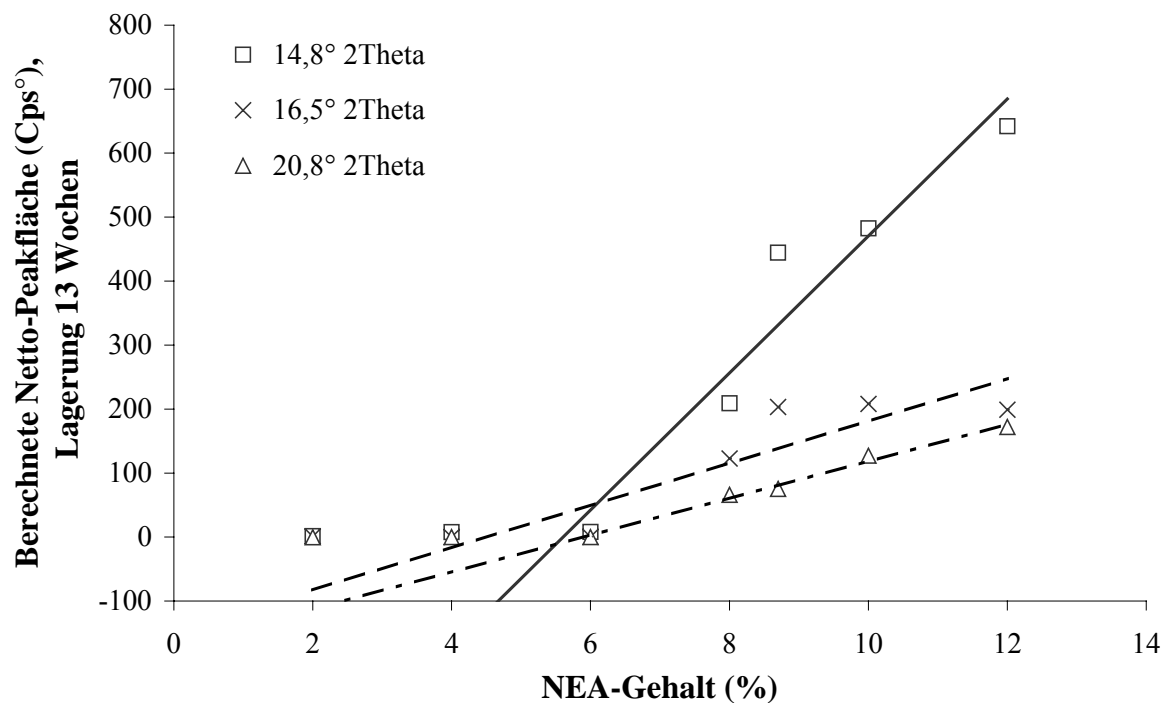


Abb. 10.4. Abhängigkeit der berechneten Netto-Peakfläche nach 13 Wochen Lagerung bei Raumtemperatur vom NEA-Gehalt der Laminate. Konzentrationen ohne messbare Kristallisation sind nicht in die Korrelation einbezogen.

Die Auftragung der berechneten Peakflächen für die charakteristischen NEA-Reflexe in Abhängigkeit vom Arzneistoffgehalt ergab oberhalb der Sättigungskonzentration lineare Funktionen. Wie in Abb. 10.4 dargestellt, liegt der Schnittpunkt der Funktionen mit der Abszisse bei einem NEA-Gehalt von 4,5 bis 6 %. Die mittels Pulverröntgenbeugung bestimmte Sättigungslöslichkeit lag damit wiederum höher als die mikroskopisch bestimmte, da die Pulverröntgenbeugung weniger empfindlich war. Die Detektionsgrenze lag bei 1 bis 2 % kristallinem Anteil im Polymer.

### 10.3 Mikrokalorimetrische Messung

Der Kristallisationsprozess wurde ebenfalls mikrokalorimetrisch verfolgt. Wie erwartet stieg der Arzneistoff-immanente Wärmefluss mit steigender Arzneistoffkonzentration und mithin steigender Kristallmenge an (Abb. 10.5).

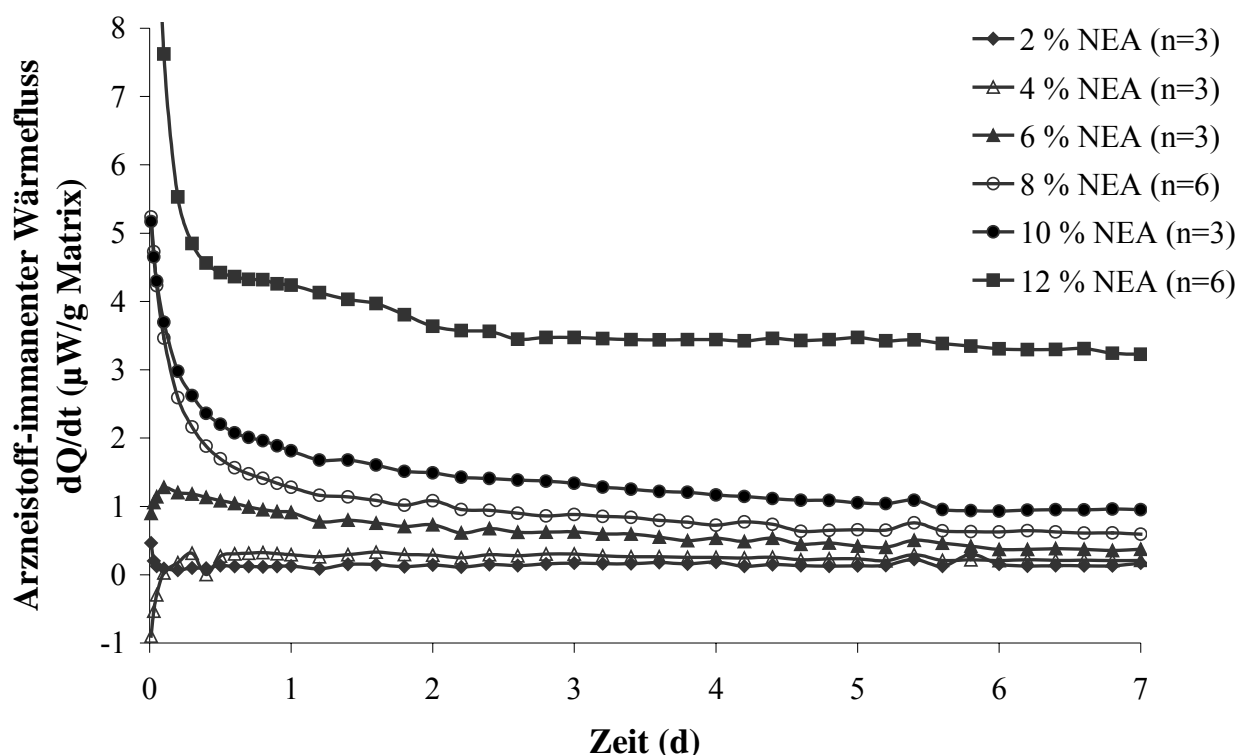


Abb. 10.5. Konzentrationsabhängiger Arzneistoff-immanenter Wärmefluss von NEA-haltigen TTS bei 25°C.

Während im Polarisationsmikroskop bei einem Gehalt von 2 % NEA innerhalb eines Jahres kein Kristallwachstum nachgewiesen werden konnte, wurde bei dieser Konzentration im Mikrokalorimeter ein geringer Arzneistoff-immanenter Wärmefluss von  $0,15 \mu\text{W/g}$  gemessen. Dieser Wärmefluss weist auf physikalische oder chemische Prozesse im ausgestanzten Laminat hin. Die Mikrokalorimetrie erweist sich damit als sehr empfindlich aber nicht spezifisch, sodass sie keine Informationen über die Art dieser Prozesse liefert.

Mithilfe der HPLC wurde eine geringe Zersetzung bei Raumtemperatur beobachtet. Die stärkste Zersetzung fand zum  $6\alpha$ -Hydroxynorethisteronacetat statt, wobei sich innerhalb eines Jahres 0,2 % des Wirkstoffs dazu umwandeln (siehe Kap. 13.1). Die anderen Zersetzungsprodukte entstanden in wesentlich geringerem Ausmaß. Die Zersetzung des NEA erwies sich damit als etwa doppelt so hoch wie die des E2-hemihydrats, sodass der geringfügige Wärmefluss unter Umständen auf die Zersetzungsreaktion zurückgeführt werden könnte. Eher ist jedoch davon auszugehen, dass es sich bei dem Wärmefluss um einen Fehler innerhalb der Messunsicherheit von  $\pm 0,1 \mu\text{W}$  (sowohl für die PLA- als auch die VER-Messung) bzw. um Einflüsse durch eine geringe Basisliniendrift während der Messung handelte.

Wie bereits beschrieben, verstärkte sich mit steigender Arzneistoffkonzentration der Kristallisationsprozess und damit verbunden der Arzneistoff-immanente Wärmefluss. Lamine mit einem NEA-Gehalt von 4 % ergaben einen Arzneistoff-immanenten Wärmefluss von  $0,3$  bis  $0,2 \mu\text{W/g}$  Matrixmasse innerhalb der Messperiode von 1 bis 7 Tage, wobei der Kristallisationsprozess mikroskopisch erst nach 5 Wochen detektiert werden konnte. Dies unterstreicht den Vorteil der Mikrokalorimetrie bei der Untersuchung von Kristallisationsprozessen in neu entwickelten Formulierungen. Auf der anderen Seite ist die Mikroskopie spezifischer und ermöglicht detailliertere Aussagen über die Morphologie der Kristalle.

Um die Edelstahllampullen mit den Laminaten zu füllen, wurden kleine Scheiben mit einem Durchmesser von 10 mm ausgestanzt. Die Scherkraft, die für das Ausstanzen benötigt wurde, lieferte auch bei NEA ausreichend Energie für die Bildung von Kristallkeimen an den Schnittkanten der Lamine. Diese induzierten Kristallkeime führten zu einer verstärkten Kristallisation an den Schnittkanten, was durch mikroskopische Beobachtung

bestätigt wurde und den starken initialen Wärmefluss hervorrief. Während der Messung sank der Arzneistoff-immanente Wärmefluss kontinuierlich ab (Abb. 10.5). Ein zweites Maximum, welches ein Hinweis auf eine weitere Kristallkeimbildung innerhalb der ausgestanzten Scheiben sein würde, trat in den Wärmeflusskurven der NEA-haltigen Lamine nicht auf. Es kann deshalb angenommen werden, dass es sich bei den Kristallisationsvorgängen hauptsächlich um ein Kristallwachstum an den bereits zu Beginn vorhandenen Keimen handelte. Wegen der durch das Ausstanzen zugeführten Energie und der Initiation von Kristallkeimen konnte mikrokolorimetrisch keine Induktionszeit für die Kristallbildung beobachtet werden. Die Mikrokolorimetrie zeigte sowohl eine ansteigende Wärmemenge über 7 Tage als auch einen steigenden initialen Wärmefluss mit steigendem NEA-Gehalt (Abb. 10.6).

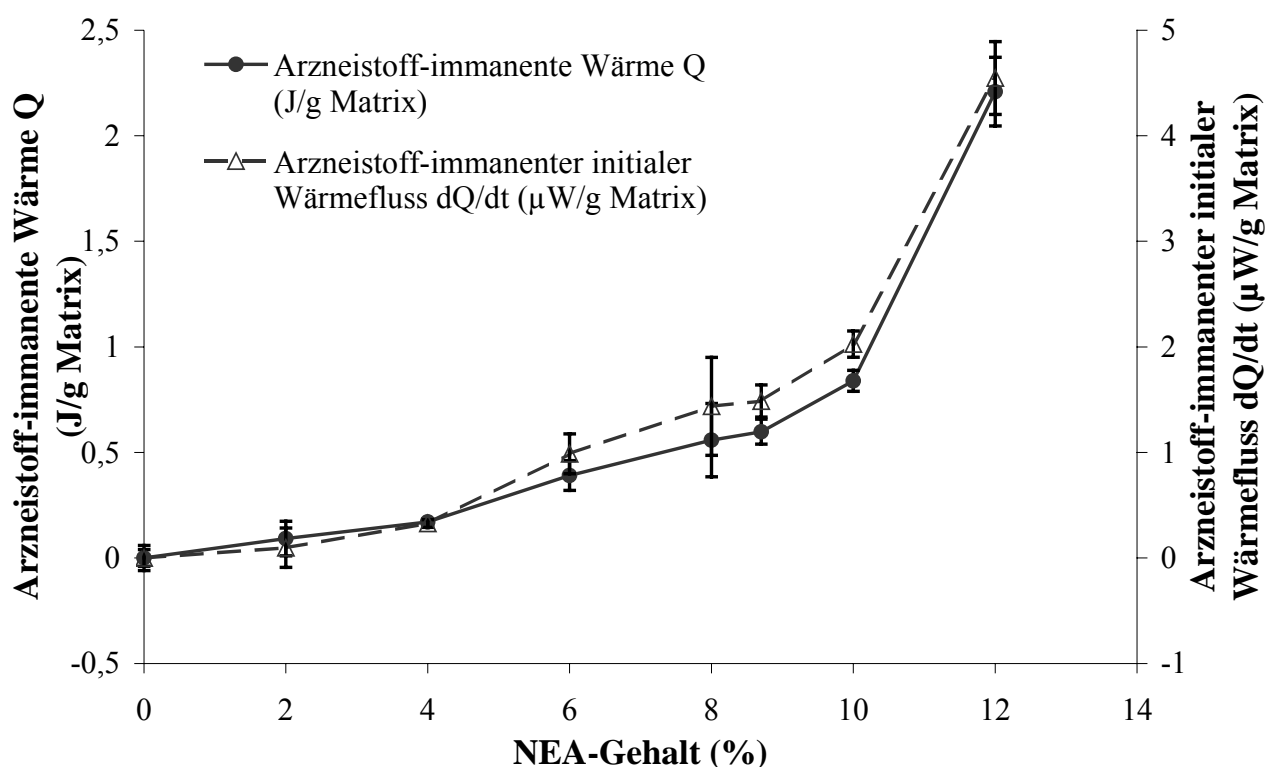


Abb. 10.6. Korrelation zwischen der berechneten Arzneistoff-immanenten Wärme über 7 Tage sowie dem initialen Wärmefluss bei 25°C in Abhängigkeit vom NEA-Gehalt.

Theoretisch sollte, wenn die Kristallisation mit konstanter Geschwindigkeit abläuft, zwischen der Wärmemenge und dem Arzneistoffgehalt zu jedem Zeitpunkt des Kristallisationsprozesses eine lineare Beziehung bestehen, d.h. unabhängig von der Arzneistoffkonzentration kristallisiert die gleiche Fraktion der übersättigten Lösung. Diese lineare Abhängigkeit wurde während der Messzeit von 7 Tagen nur für die Lamine mit einem NEA-Gehalt von 4 bis 10 % erreicht (Abb. 10.6). Dieser Bereich scheint dem isokinetischen Konzentrationsbereich mit konstanter Kristallisationsgeschwindigkeit zu entsprechen. Für jede Substanz und Kristallgestalt existiert solch ein isokinetischer Temperatur- oder Konzentrationsbereich, in dem die Kinetik des Phasenübergangs konstant bleibt (Avrami 1939). Ein höherer Arzneistoffgehalt von 12 % NEA gab dagegen mehr Wärme frei, als theoretisch zu erwarten gewesen wäre. Die Wärmemenge erhöhte sich ungefähr um den Faktor 2,6, wobei der NEA-Gehalt nur von 10 auf 12 %, d.h. um den Faktor 1,2, anstieg. Daraus kann geschlossen werden, dass der Kristallisationsprozess bei diesem hohen Grad der Übersättigung wegen der außergewöhnlich starken thermodynamischen Instabilität der Systeme beschleunigt war.

Die vergleichsweise kurze Messzeit von 7 Tagen ermöglichte keine Bestimmung der Kristallisationsenthalpie  $\Delta H_{\text{krist}}$  von NEA, weil der Kristallisationsprozess nicht abgeschlossen war. Eine Messzeit von 4 Wochen war nötig, um den größten Teil des Kristallisationsvorganges in den Pflastern zu erfassen und daraus die Kristallisationswärme bestimmen zu können (Abb. 10.7). Allerdings wurde auch nach einer Messzeit von 4 Wochen ein sehr geringer exothermer Arzneistoff-immanenter Wärmefluss von  $0,2 \mu\text{W/g}$  Matrix in allen untersuchten Pflastern unabhängig von deren Arzneistoffkonzentration registriert. Geht man davon aus, dass nach dieser Messzeit von allen Laminen die gleiche Wärmemenge entwickelt wird, so bleibt die Differenz zwischen den Kristallisationswärmen, die von den Proben verschiedener Arzneistoffgehalte freigegeben werden, gleich. Bei längeren Messzeiten würden die Schwankungen in der Basislinie zu einer Erhöhung des Messfehlers führen. Die gewählte Messzeit war ausreichend, um zuverlässig und genau die Kristallisationsenthalpie zu bestimmen. Die Steigung in Abb. 10.7 entspricht der Kristallisationsenthalpie von  $-22,8 \pm 2,6 \text{ kJ/mol}$  NEA in der PEG-haltigen Polyacrylatmatrix.

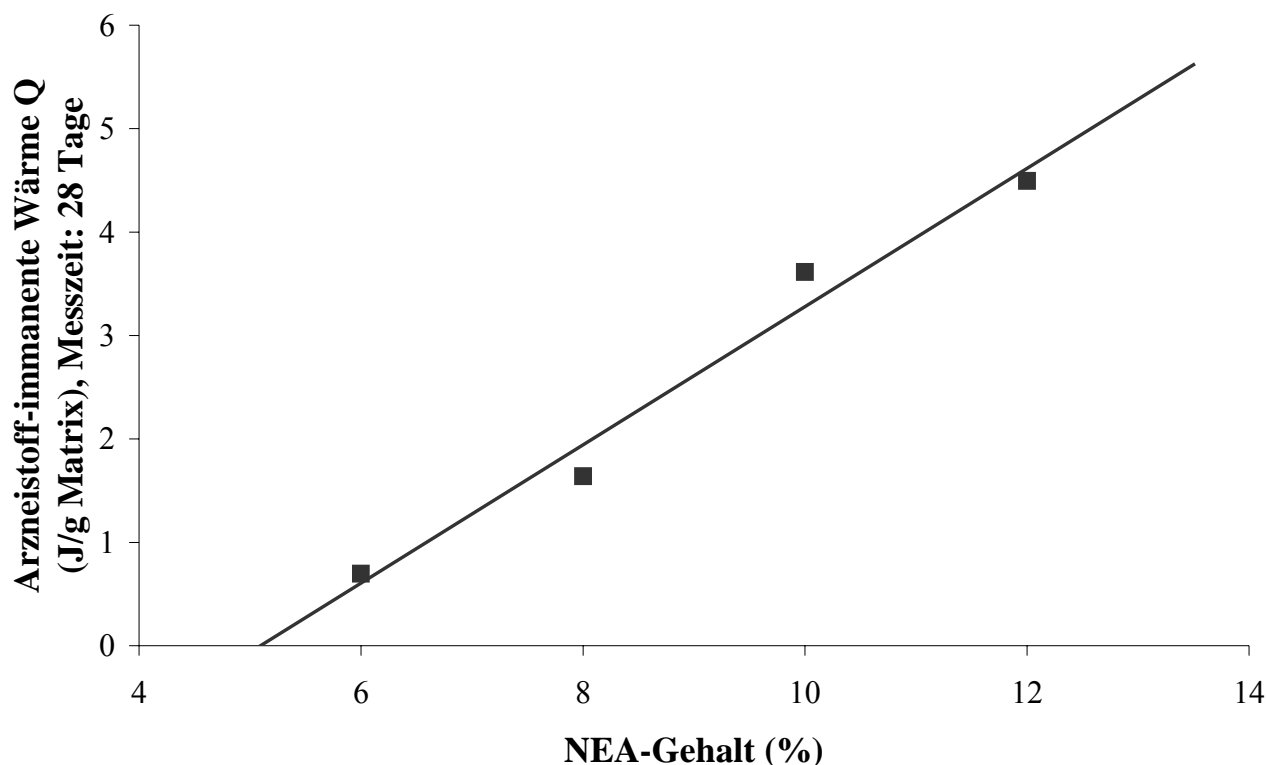


Abb. 10.7. Lineare Korrelation zwischen der Arzneistoff-immanenten Wärme über eine Messzeit von 28 Tagen bei 25°C in Abhängigkeit vom NEA-Gehalt.

## 10.4 HPLC-Bestimmung der Sättigungslöslichkeit

Die Sättigungskonzentration von NEA in den Laminaten wurde auch mittels HPLC nach Gleichgewichtseinstellung zwischen einer übersättigten, NEA-haltigen Schicht und einer anfänglich arzneistofffreien Schicht, welche durch eine semipermeable Membran getrennt waren, bestimmt. Bei der Verwendung von Arzneistoffkonzentrationen von 8 bzw. 10 % NEA in den Laminaten wurde eine durchschnittliche Löslichkeit von 3,85 % unter Kristallisationsbedingungen gemessen (Tab. 10.1). Diese stimmt gut mit dem polarisationsmikroskopisch bestimmten Wert von  $\leq 4$  % überein.

NEA-Gehalt bei Herstellung	NEA-Gehalt der Placebo-Schicht nach Lagerung
8 %	3,6 %
10 %	4,1 %

Tab. 10.1. Bestimmung der Sättigungskonzentration von NEA mittels HPLC nach 2-monatiger Lagerzeit bei Raumtemperatur.

## 10.5 Kristallisationskinetik

Um die kristallisierte NEA-Fraktion  $x(t)$  zum Zeitpunkt  $t$  aus der gemessenen Wärmemenge  $Q(t)$  berechnen zu können, wurden die Werte von 4 % für die Sättigungslöslichkeit und 66,8 J/g als Kristallisationsenthalpie  $\Delta H_{\text{krist}}$  verwendet. Abb. 10.8 zeigt die kristallisierte Fraktion  $x(t)$  als Funktion von der Zeit. Bei einer annähernd konstanten Kristallisationsgeschwindigkeit im Konzentrationsbereich von 6 bis 10 % NEA entstand innerhalb einer Woche eine Kristallfraktion von ungefähr 0,2. Lamine mit einem Arzneistoffgehalt von 12 % zeigten wegen des beschleunigt ablaufenden Prozesses einen etwa doppelt so hohen Kristallisationsgrad.

In Abb. 10.9 wurde die kristallisierte Fraktion als linearer Ausdruck der JMA-Gleichung gegen die Zeit aufgetragen (Gl. 44). Die lineare Avrami-Korrelation ermöglicht die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante  $k$  sowie des Avrami-Exponenten  $n$  (Tab. 10.2). Der Wert des Avrami-Exponenten  $n$  liegt nahezu konstant für alle untersuchten Konzentrationen bei 0,75. Dieser niedrige Wert für  $n$  bestätigt ein eindimensionales Kristallwachstum (Tab. 5.2). Er weist darauf hin, dass bereits zum Beginn der Messung praktisch alle Kristallkeime vorhanden waren und kaum zusätzliche Kristallkeime während der mikrokalorimetrischen Messung gebildet wurden, was bereits durch die Abwesenheit eines zweiten Wärmeflussmaximums vermutet wurde. Das lange Tailing der kalorimetrischen Kurven kann in Bezug zum diffusionskontrollierten Wachstum gesetzt werden (Abb. 5.3b), wobei der theoretische Avrami-Exponent  $n$  eine Größe von 0,5 hätte (Pradell et al. 1998). Der gemessene Wert liegt mit 0,75 etwas darüber, was vermutlich auf eine geringe Kristallkeimbildungstendenz im Pflasterinneren zurückzuführen ist.



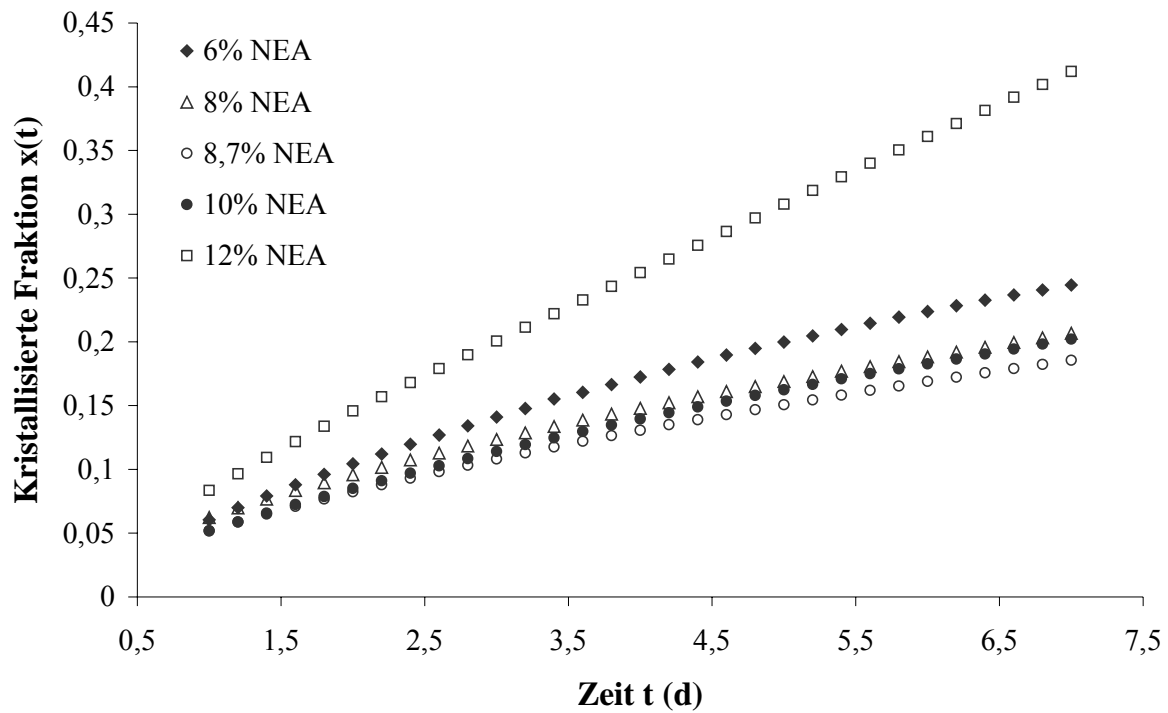


Abb. 10.8. Abhängigkeit der berechneten kristallisierten NEA-Fraktion in den TTS von der Zeit (Kristallisationsenthalpie: 66,8 J/g, Sättigungslöslichkeit: 4 % NEA).

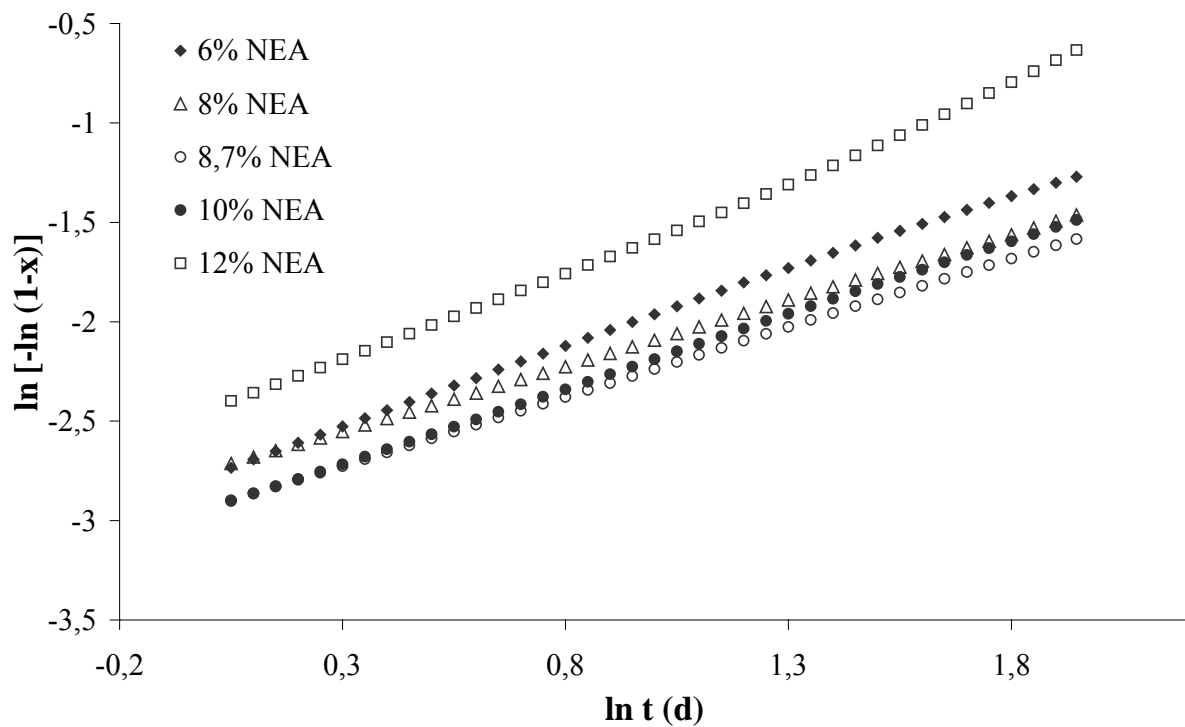


Abb. 10.9. Klassische doppelt-logarithmische Auftragung der Avrami-Gleichung der NEA-Kristallisation.

NEA-Gehalt (%)	Übersättigung	Avrami-Exponent n	k (1/d <sup>n</sup> )	k* (1/d)
6,0	0,5	0,79	0,0628	0,0297
8,0	1,0	0,66	0,0642	0,0153
8,7	1,2	0,69	0,0533	0,0147
10,0	1,5	0,75	0,0531	0,0197
12,0	2,0	0,91	0,0856	0,0666

Tab. 10.2. Experimentell für die NEA-Kristallisation bestimmte Avrami-Parameter.

Die Geschwindigkeitskonstante  $k^*$  betrug im Konzentrationsbereich von 6 bis 10 % NEA durchschnittlich 0,02 1/d. Lamine mit einem Arzneistoffgehalt von 12 % zeigten dagegen einen beschleunigten Kristallisationsprozess, der mit einer höheren Geschwindigkeitskonstante von 0,07 1/d verbunden ist. Es ist allgemein bekannt, dass die Kristallisationsgeschwindigkeit und die Anzahl der Kristalle (Gl. 42) mit steigender Übersättigung ansteigen (Ma et al. 1996).

## 10.6 Temperaturabhängigkeit der Kristallisation

Die innerhalb von 7 Tagen entwickelte Kristallisationswärme wurde für ein 8 %iges NEA-Laminat in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Während die Placebo-Lamine einen starken Anstieg des gemessenen Wärmeflusses mit steigender Temperatur zeigten, ergaben die Arzneistoff-immanenten Wärmeflusskurven der wirkstoffhaltigen Lamine nahezu deckungsgleiche Kurven (Abb. 10.10). Die Kristallisation wurde demzufolge durch eine Temperaturerhöhung von 25°C auf 45°C nicht beschleunigt, sondern blieb konstant. Eigentlich sollte bei erhöhter Temperatur eine verstärkte Kristallisationsneigung auftreten, da durch die Temperaturerhöhung die Mobilität der Moleküle steigt und die Diffusion zu den Kristallkeimen gefördert ist (Laarhoven et al. 2002). Damit einher geht jedoch auch eine Erhöhung der Löslichkeit der Arzneistoffe im Polymer, was einen umgekehrten Effekt auf die Kristallisationsneigung besitzt und vermutlich den Grund für den unveränderten Wärmefluss darstellt. Außerdem ist durch die Temperaturerhöhung auch mit einer

beschleunigten Zersetzung zu rechnen, die unter Umständen ebenfalls erfasst wird und die Interpretation der Wärmeflusskurven erschwert.

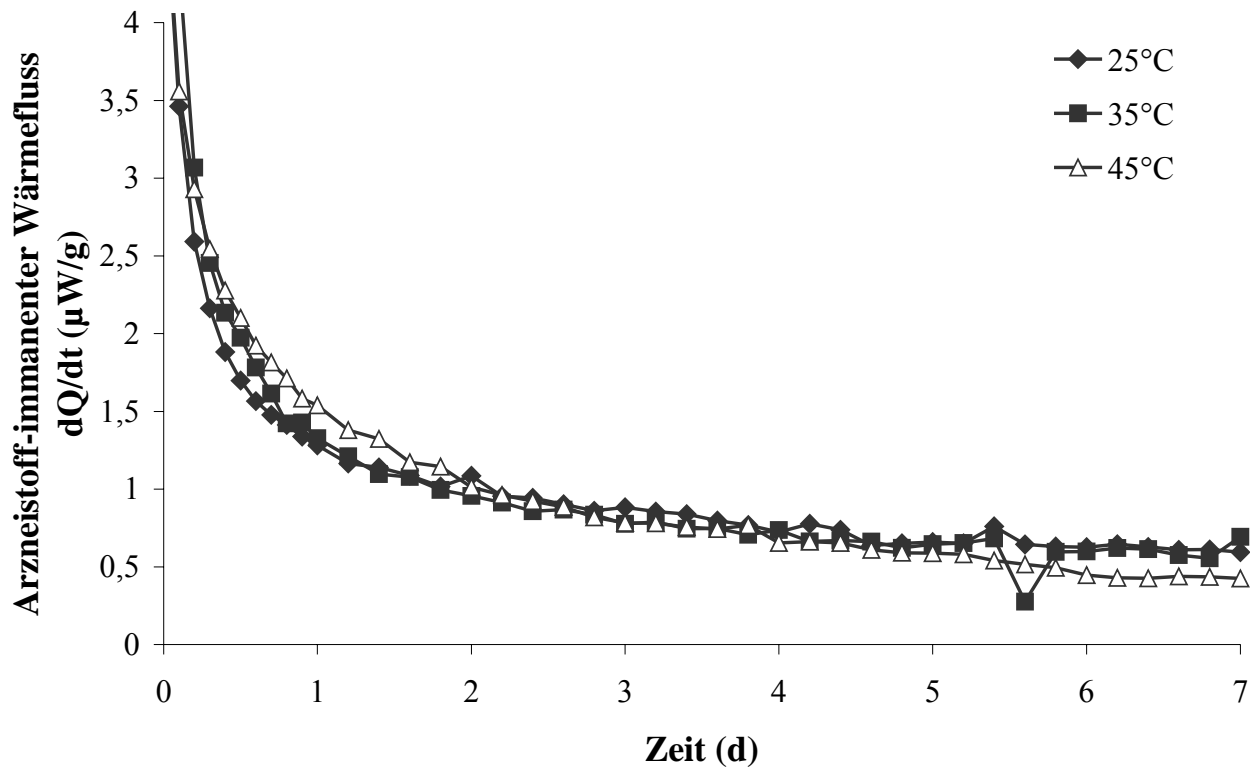


Abb. 10.10. Arzneistoff-immanenter Wärmefluss eines 8 %igen NEA-haltigen TTS in Abhängigkeit von der Messtemperatur.

## 11 TTS mit Hormonkombination

Neben der Kristallisation von E2-hemihydrat und NEA aus Ethylacetat wurde auch die Kristallisation verschiedener Mischungen in den TTS-Laminaten untersucht. Anhand der Pulverdiffraktometrie und der DSC konnte gezeigt werden, dass sich bei der Kombination der Hormone entsprechend ihrem Verhältnis aus Ethylacetat mindestens eine neue Kristallphase mit neuem Reflexmuster bzw. Schmelzpunkt ausbilden kann, bei der auch von einer unterschiedlichen Kristallisationsenthalpie ausgegangen werden muss (Kap. 7.3).

### 11.1 Kristallisation in TTS mit 8,7 % NEA und verschiedenen E2-hemihydrat-Konzentrationen

#### 11.1.1 Polarisationsmikroskopie

Die Lamine, die 8,7 % NEA und verschiedene Mengen an E2-hemihydrat enthielten, wurden während der Lagerung bei Raumtemperatur polarisationsmikroskopisch auf die Gegenwart und Form von Kristallen untersucht (Abb. 11.1). Die Lamine waren direkt nach der Herstellung vollständig amorph und kristallfrei. In Abhängigkeit von der enthaltenen E2-Konzentration begann die Kristallbildung zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Induktionszeit, d.h. die Zeit bis Kristallisationsprozesse polarisationsmikroskopisch sichtbar wurden, nahm mit steigendem Gehalt an E2-hemihydrat ab (Tab. 11.1). Durch Erhöhung des E2-hemihydrat-Gehaltes bei konstanter NEA-Konzentration von 8,7 % verdichtete sich der Kristallteppich während der Kristallisation wesentlich. Sogar ein geringer Anstieg der E2-hemihydrat-Konzentration förderte den Kristallisationsprozess stark.

Bei der Kombination von E2-hemihydrat mit NEA entstanden nadelförmige Kristalle, die sich zu federförmigen Kristallbüscheln zusammenlagerten. Die Nadeln haben einen Durchmesser von 10 bis 20  $\mu\text{m}$  und eine Länge von ungefähr 300  $\mu\text{m}$ . Zusätzlich zu dieser neuen federförmigen Kristallstruktur traten je nach Verhältnis der Wirkstoffe zueinander die prismatischen Kristallformen des E2-hemihydrats (Abb. 11.1a und d) oder das dendritische

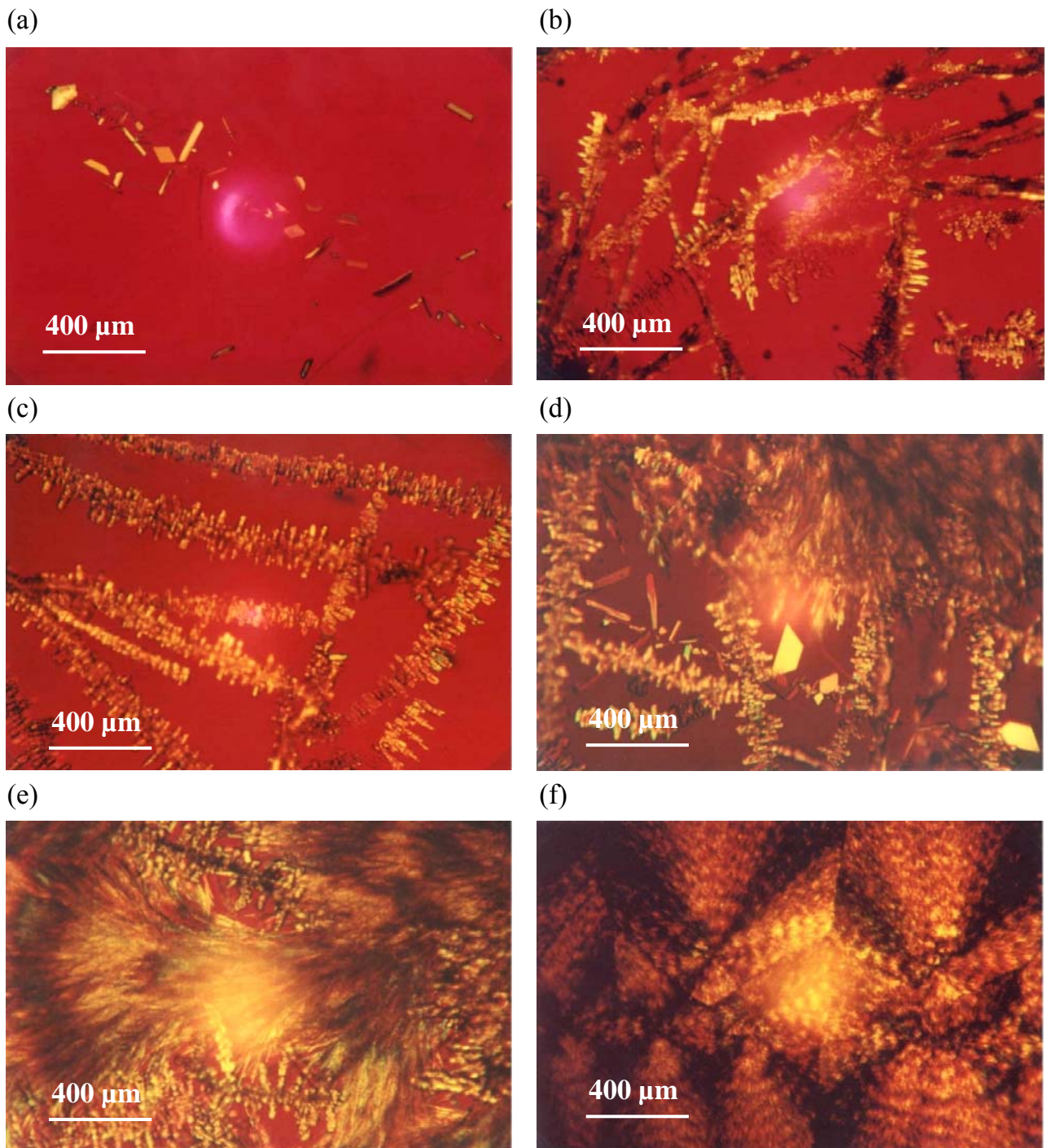


Abb. 11.1. Polarisationsmikroskopie von 8,7 % NEA-haltigen TTS mit steigendem E2-Gehalt nach einer Lagerzeit von 8 Wochen bei Raumtemperatur: (a) 1,5 % E2-hemihydrat, (b) 8,7 % NEA, (c) 8,7 % NEA und 0,75 % E2-hemihydrat, (d-e) 8,7 % NEA und 1,5 % E2-hemihydrat, (f) 8,7 % NEA und 2,5 % E2-hemihydrat.

E2-Anteil an der Arzneistoffmenge	NEA-Gehalt (%)	E2-hemihydrat-Gehalt (%)	Mikroskopische Induktionszeit (d)
7,9 %	8,7	0,75	7
14,7 %	8,7	1,5	3
22,3 %	8,7	2,5	1
28,7 %	8,7	3,5	< 1

Tab. 11.1. Induktionszeit in Abhängigkeit vom E2- Gehalt in den Kombinationspflastern.

E2-Gehalt (%)	-	0,75	1,5	2,5	3,5	2,5	3,0
NEA-Gehalt (%)	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	4,0	-
Nadelförmige E2-Kristalle			+	+	++	++	++
Dendritische NEA-Kristalle	++	++	++	+	+		
E2/NEA-Kristallfedern			+++	+++	+++	+++	

Tab. 11.2. Übersicht über die mikroskopischen Kristallstrukturen in Abhängigkeit vom Verhältnis zwischen E2-hemihydrat und NEA.

Kristallwachstum der NEA-Kristalle auf (Abb. 11.1b, d und e). Nur bei einem E2-Gehalt von 0,75 %, d.h. bei vollständiger Löslichkeit des E2-hemihydrats in der Matrix, war ausschließlich das dendritische Kristallwachstum des NEA zu erkennen (Abb. 11.1c). Bei einem E2-hemihydrat-Gehalt von 22 % bzw. 29 % an der Gesamtarzneistoffkonzentration wurden fast ausschließlich federförmige Kristalle beobachtet (Abb. 11.1f). Es kann angenommen werden, dass die federförmige Struktur die dominierende Kristallform der Mischung aus E2-hemihydrat und NEA darstellt. Je nach Verhältnis der Hormone zueinander wurden die verschiedenen Kristallformen in unterschiedlichem Ausmaß sichtbar (Tab. 11.2).

Stefano et al. (1997) isolierten federförmige Kristalle aus der polymeren Matrix und stellten fest, dass die isolierten Kristalle aus einer Kombination von NEA und E2 bestanden. Kristalle unterschiedlicher Form enthielten dabei verschiedene Verhältnisse von E2/NEA.

### 11.1.2 Pulverröntgenbeugung

Ähnlich den Kristallen, die durch Kristallisation aus Ethylacetat erhalten wurden, führte die gemeinsame Kristallisation von NEA und E2-hemihydrat in der polymeren Matrix zu neuen Kristallstrukturen, die mithilfe der Pulverröntgenbeugung eindeutig zu identifizieren waren (Abb. 11.2). Während die charakteristischen Reflexe für NEA bei  $14,8^\circ$ ,  $16,5^\circ$  und  $20,8^\circ$   $2\theta$  (Abb. 11.2a) bei gleichem Alter mit steigendem E2-Gehalt langsam absanken, erschienen bei der Kristallisation zusätzliche Reflexe bei  $8,9^\circ$   $2\theta$  und  $11,8^\circ$   $2\theta$ , die durch den steigenden E2-Anteil begründet, aber nicht charakteristisch für E2-hemihydrat waren. Diese Reflexe unterschieden sich auch von denen der Kristalle aus Ethylacetat. Das bedeutet, dass sich in der Matrix im Vergleich zum Lösungsmittel eine veränderte neue Kristallphase ausbildete. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Arzneistoff und dem Polymer können die kristalline Struktur verändern und zu einem veränderten Röntgenmuster führen. Ein ähnliches Auftreten von neuen Kristallformen im Polymernetzwerk wurde bereits für Pilocarpin in Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikeln (Harmia et al. 1986) sowie für Piroxicam in Polyvinylpyrrolidon (Tantishaiyakul et al. 1999) beschrieben.

Während die Mikroskopie keine quantitative Bestimmung der gebildeten Kristalle zulässt, kann eine semiquantitative Auswertung mittels Pulverröntgenbeugung erfolgen. Diese ist auf den ansteigenden Reflexintensitäten während der Lagerung begründet. Auch verschiedene Kristallstrukturen innerhalb einer Mischung können hierbei voneinander unterschieden werden, wenn die jeweiligen charakteristischen Reflexe bekannt sind (Lehto & Laine 1997 & 1998, Fukuoka et al. 1989).

Die Reflexintensitäten in den TTS stiegen so lange kontinuierlich mit der Alterung an, bis der Kristallisationsprozess beendet war (Abb. 11.3 und Abb. 11.4). Obwohl der NEA-Gehalt in den Laminaten konstant gehalten wurde, war der Anstieg des charakteristischen Reflexes bei  $14,8^\circ$   $2\theta$  umso flacher, je höher der E2-hemihydrat-Gehalt war (Abb. 11.3). E2-hemihydrat hemmte also die NEA-Kristallisation während der ersten Monate des Kristallisationsprozesses. Trotzdem zeigten diese Lamine nach 6 Monaten unabhängig vom E2-Gehalt die gleichen Netto-Reflexflächen bei  $14,8^\circ$   $2\theta$ . Der Kristallisationsprozess war nach dieser Zeit anscheinend abgeschlossen, sodass die Menge der gebildeten NEA-Kristalle wegen der konstanten NEA-Konzentration in allen Proben gleich war

(thermodynamischer Zustand der Gleichgewichts). Nur das Laminat mit 3,5 % E2-hemihydrat und 8,7 % NEA zeigte beim Kristallisationsende eine geringere Reflexintensität bei  $14,8^\circ 2\theta$ . Ein Gehalt von 29 % E2-hemihydrat in der Arzneistoffmischung hemmte die NEA-Kristallisation also stark.

Die Reflexe, die bei  $8,9^\circ$  und  $11,8^\circ 2\theta$  erschienen, waren für die neue Kristallphase charakteristisch. Sie zeigten mit steigendem E2-Gehalt einen deutlichen Anstieg (Abb. 11.4). Je höher der E2-Gehalt in den Pflastern war, desto größer war auch der Anteil der neuen Kristallphase mit ihren typischen Reflexen. Die neue Kristallphase schien kinetisch bevorzugt zu sein, denn bei  $11,8^\circ 2\theta$  wurde der Endzustand schneller erreicht als das Steady state des Reflexes bei  $14,8^\circ 2\theta$ .

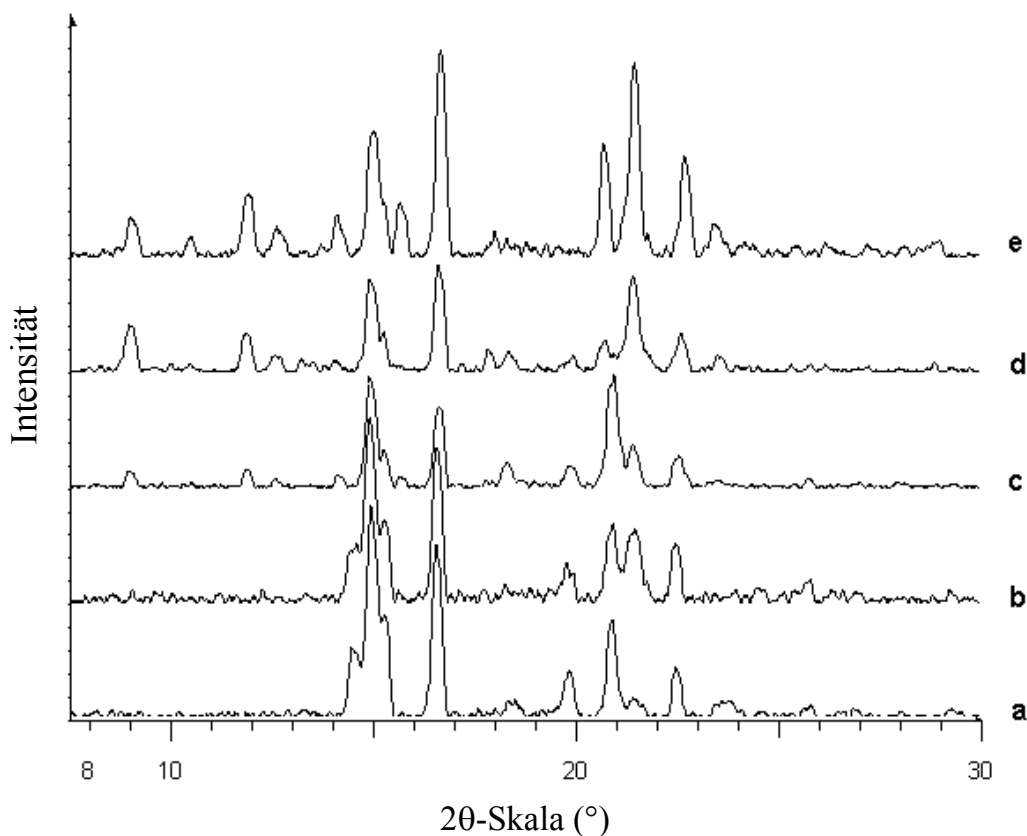


Abb. 11.2. Pulverröntgenbeugung von TTS mit 8,7 % NEA und einem steigendem E2-hemihydrat-Gehalt nach 8-wöchiger Lagerung bei Raumtemperatur: (a) 0 % E2-hemihydrat, (b) 0,75 % E2-hemihydrat, (c) 1,5 % E2-hemihydrat, (d) 2,5 % E2-hemihydrat und (e) 3,5 % E2-hemihydrat. Der Reflex bei  $21,3^\circ 2\theta$  ist durch die Probenhalterfolie begründet.



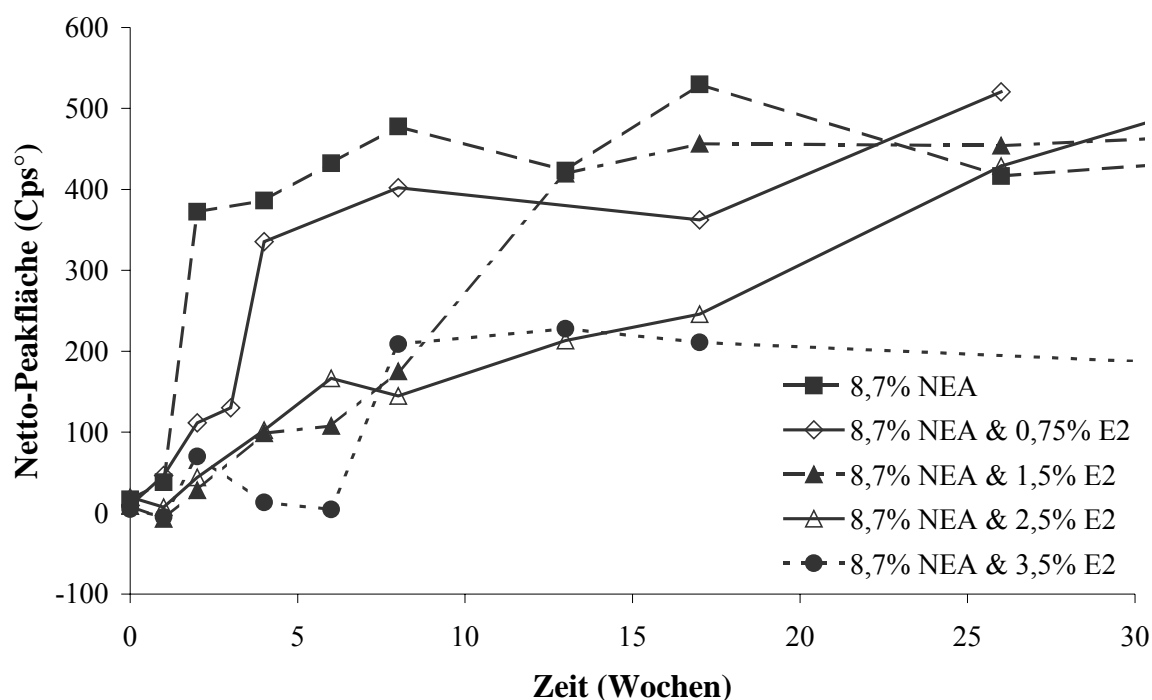


Abb. 11.3. Netto-Peakfläche für den charakteristischen NEA-Reflex bei  $14,8^\circ 2\theta$  für Kombinations-TTS mit 8,7 % NEA und verschiedenen E2-hemihydrat-Konzentrationen nach Lagerung bei Raumtemperatur. Normierung auf ein Flächengewicht von  $100 \text{ g/m}^2$ .

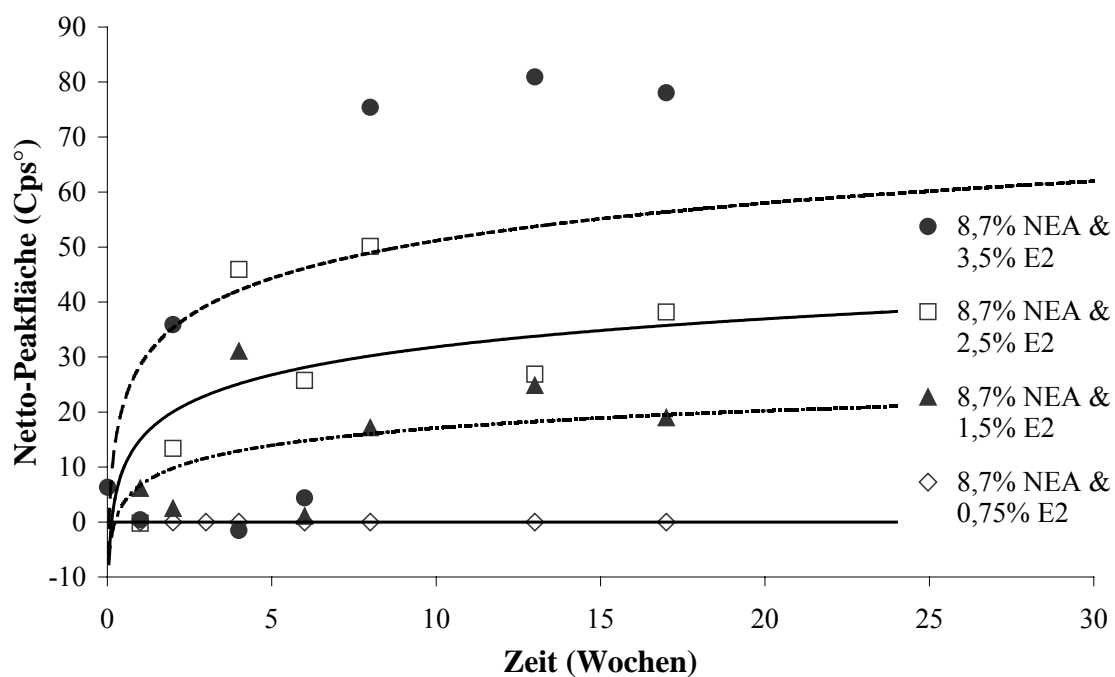


Abb. 11.4. Netto-Peakfläche der neuen Kristallphase mit dem Reflex bei  $11,8^\circ 2\theta$  in Kombinations-TTS mit 8,7 % NEA und verschiedenen Konzentrationen von E2-hemihydrat nach Lagerung bei Raumtemperatur. Normierung auf ein Flächengewicht von  $100 \text{ g/m}^2$ .

Die Netto-Peakflächen zeigten Schwankungen zwischen den Messungen bei den ausgewählten Lagerzeitpunkten. Bei Kristallisationsbeginn wurden wegen der geringeren Aktivierungsenergie vermehrt Kristallbüschel gebildet (Krüger & Woldt 1992). Andere Bereiche der Lamine waren vollständig kristallfrei. Da röntgendiffraktometrisch jeweils nur ein kleiner Ausschnitt der Lamine untersucht werden konnte, führten diese lokalen Unterschiede in der Kristallmenge zu Schwankungen, die durch Berechnung von logarithmischen Näherungsfunktionen ausgeglichen wurden (Abb. 11.4).

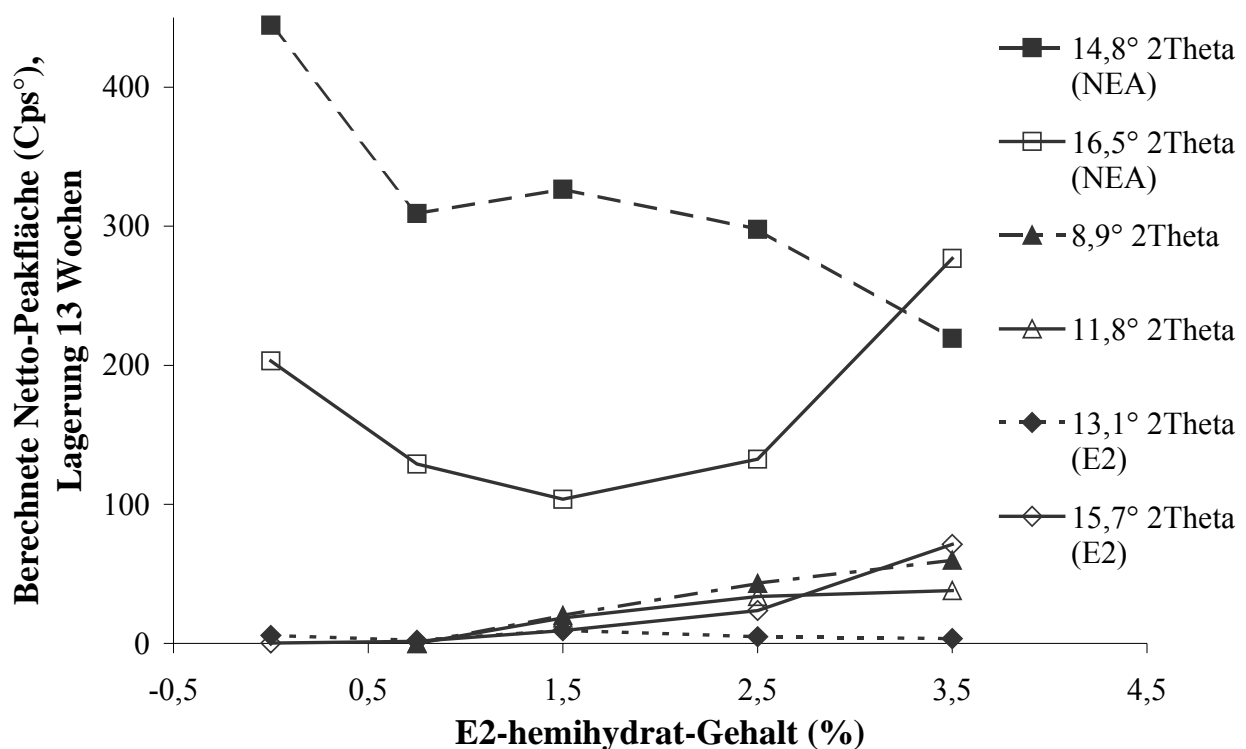


Abb. 11.5. Berechnete Netto-Peakfläche der kristallisierten TTS mit konstantem NEA-Gehalt von 8,7 % und steigender E2-hemihydrat-Konzentration nach 13-wöchiger Lagerung bei Raumtemperatur.

Nach 13-wöchiger Lagerzeit nahm die aus den Näherungsfunktionen berechnete Peakfläche des NEA-Reflexes bei  $14,8^\circ 2\theta$  mit steigendem E2-Gehalt ab (Abb. 11.5). Die trotz gleich bleibendem NEA-Gehalt abnehmende Reflexfläche kann durch die Beteiligung von NEA an der Ausbildung einer zusätzlichen Kristallform mit den typischen Reflexen bei  $8,9^\circ$  und  $11,8^\circ 2\theta$  erklärt werden, deren Intensitäten entsprechend dem erhöhten E2-Gehalt ansteigen.

Der NEA-Reflex bei  $16,5^\circ 2\theta$  dagegen nahm mit steigendem E2-Gehalt zunächst ab, stieg aber bei weiterer Erhöhung des E2-Anteils wieder an. Dieser Reflex könnte durch einen Reflex der neuen Kristallphase überlagert sein. Die charakteristischen Reflexe des E2-hemihydrat zeigten entsprechend ihrem geringen Anteil an der Wirkstoffmischung auch nur ein geringes Reflexwachstum.

### 11.1.3 Mikrokolorimetrie

Die Kristallisationsprozesse wurden ebenfalls mikrokolorimetrisch anhand des Wärmeflusses verfolgt. Eine mit steigender E2-Konzentration verstärkte und beschleunigte Kristallisation führte zu einem Anstieg des Arzneistoff-immanenten Wärmeflusses und bewirkte, dass der Wärmefluss schneller ein konstantes Wärmeflussplateau erreichte (Abb. 11.6).

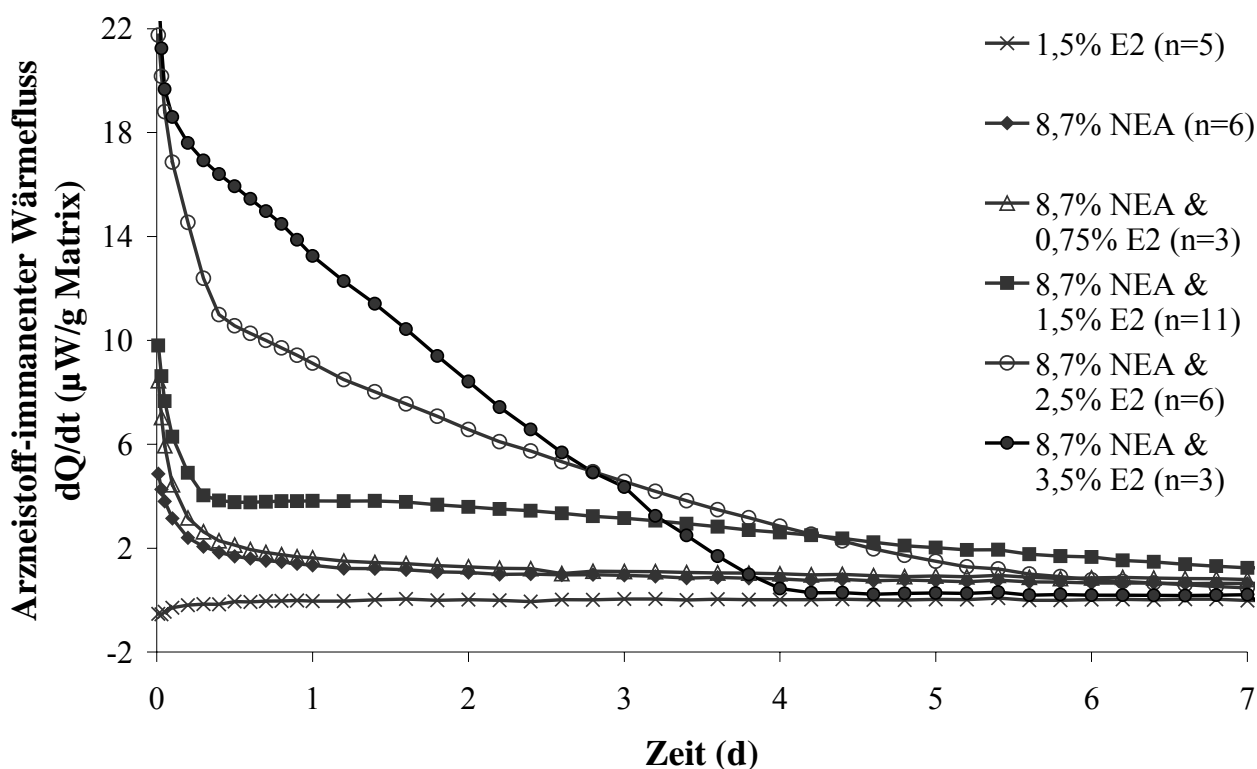


Abb. 11.6. Konzentrationsabhängiger Arzneistoff-immanenter Wärmefluss bei  $25^\circ\text{C}$  für TTS mit 8,7 % NEA und verschiedenen Konzentrationen von E2-hemihydrat.

Um den Kristallisationsmechanismus der Kombinations-TTS zu verstehen, wurden entsprechende Lamine mit einem der Arzneistoffe hergestellt. Das TTS mit 8,7 % NEA und 1,5 % E2-hemihydrat wurde in die Einzelsysteme aufgeteilt. Während das Laminat mit 1,5 % E2-hemihydrat keinen Arzneistoff-immanenten Wärmeﬂuss zeigte und das 8,7 % NEA-haltige Laminat nur einen geringen Wärmeﬂuss über 7 Tage entwickelte, wies das Kombisystem aus beiden Arzneistoffen den höchsten Wärmeﬂuss der drei Lamine auf (Abb. 11.6). Der Wärmeﬂuss des Kombisystems war höher als die Summe der Einzelsysteme. Wenn man davon ausgeht, dass die Kristallisationsenthalpie der neuen Phase nicht erheblich höher ist als die der einzelnen Arzneistoffe und der Arzneistoff-immanente Wärmeﬂuss direkt von der Kristallisationsgeschwindigkeit abhängig ist, dann ist der Kristallisationsprozess in den Kombisystemen entweder durch eine geringere Löslichkeit verstärkt oder durch die Zugabe von E2-hemihydrat stark beschleunigt. Die Kristallisation der Arzneistoffmischung stellt demnach keinen getrennten Prozess der beiden Arzneistoffe dar, sondern beruht auf einer physikalischen Interaktion zwischen den Arzneistoffen.

Der Kristallisationsprozess einer Mischung aus den Arzneistoffen innerhalb der TTS-Lamine war nicht von der Gesamtarzneistoffkonzentration, sondern insbesondere von der des E2-hemihydrats abhängig, was von Stefano et al. (1997) bereits beschrieben wurde. Die Rezeptur TTS VER 2 gab trotz des höheren Gesamtarzneistoffgehaltes über 7 Tage weniger Wärme ab als TTS VER 9 mit seinem anteilmäßig höherem E2-Gehalt (Tab. 11.3).

TTS-Rezeptur	E2 (%)	NEA (%)	Gesamt- Arzneistoff- gehalt (%)	Arzneistoff-immanente Wärmemenge (J/g Matrix)
VER 2	1,5	8,7	10,2	1,72
VER 9	2,5	4,0	6,5	2,19
VER 3	2,5	8,7	11,2	2,72

Tab. 11.3. Kristallisationswärme bei 25°C über 7 Tage in Abhängigkeit vom E2-Gehalt.

#### 11.1.4 Einfluss des Ausstanzens auf die Wärmeflusskurve

Durch die mikrokolorimetrische Messung eines aufgerollten TTS-Laminates der Rezeptur TTS VER 2 konnte gezeigt werden, dass der starke exotherme Wärmefluss zu Beginn jeder mikrokolorimetrischen Messung auf Ausstanzeffekten beruht und nicht durch Effekte des Ablassens der Ampullen in die Messposition oder durch Adsorptionseffekte von Wasserdampf entsteht. Das aufgerollte TTS-Laminat besaß, da ein langer Streifen nach Entfernung der Abziehfolie aufgerollt wurde, wesentlich weniger Schnittkanten, an denen die Kristallbildung initiiert wurde. Diese Rolle konnte gut in die Edelstahllampullen überführt werden. Die Wärmeflusskurve der Rolle zeigte keinen starken initialen Wärmefluss, sondern einen langsamen Anstieg des Wärmeflusses, der nach ungefähr einem Tag sein Maximum erreichte und auf die Kristallkeimbildung im Inneren der Lamine zurückzuführen war (Abb. 11.7). Eine hohe Anzahl von Kristallkeimen wurde als höherer Signalpeak detektiert, weil mehr Wärme zu Beginn frei wurde und mehr Kristalle mit der gleichen Geschwindigkeit zu wachsen begannen (Darcy & Wiencek 1998). War die Keimbildung abgeschlossen, so zeigte sich wie bei den ausgestanzten Laminaten ein langsam abfallender Wärmefluss.

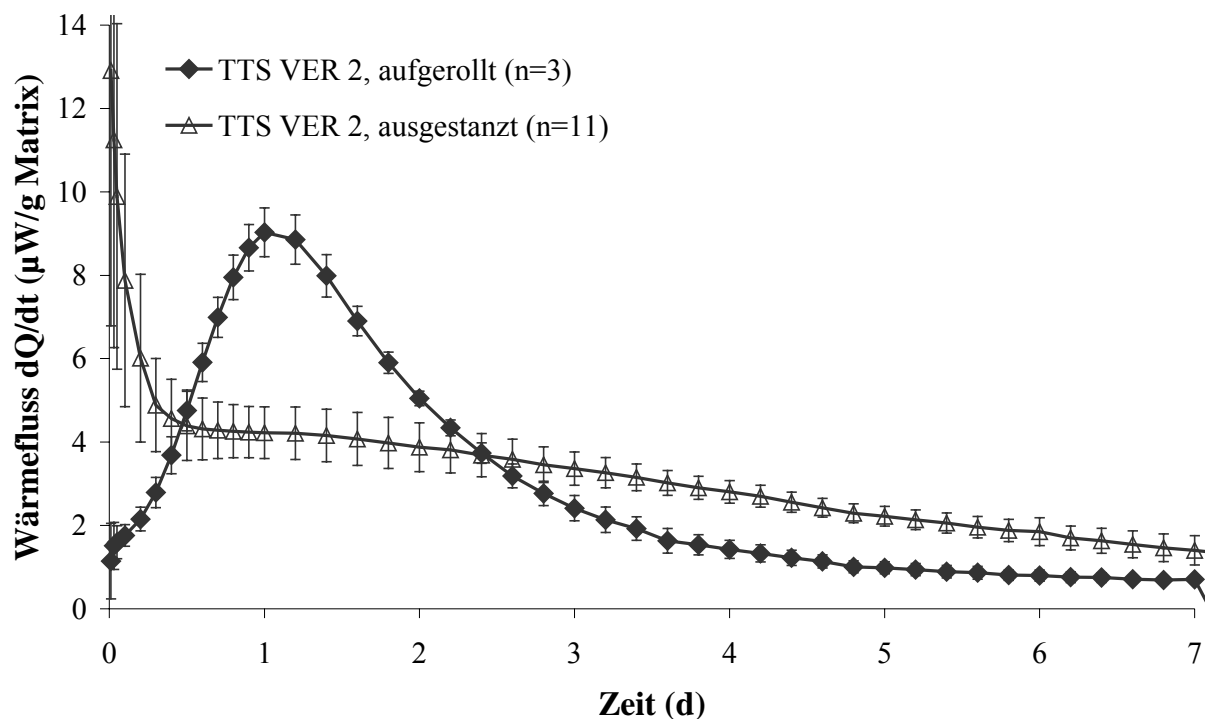


Abb. 11.7. Mikrokolorimetrische Wärmeflusskurven des TTS VER 2 bei 25°C für ausgestanzte und gerollte Lamine.

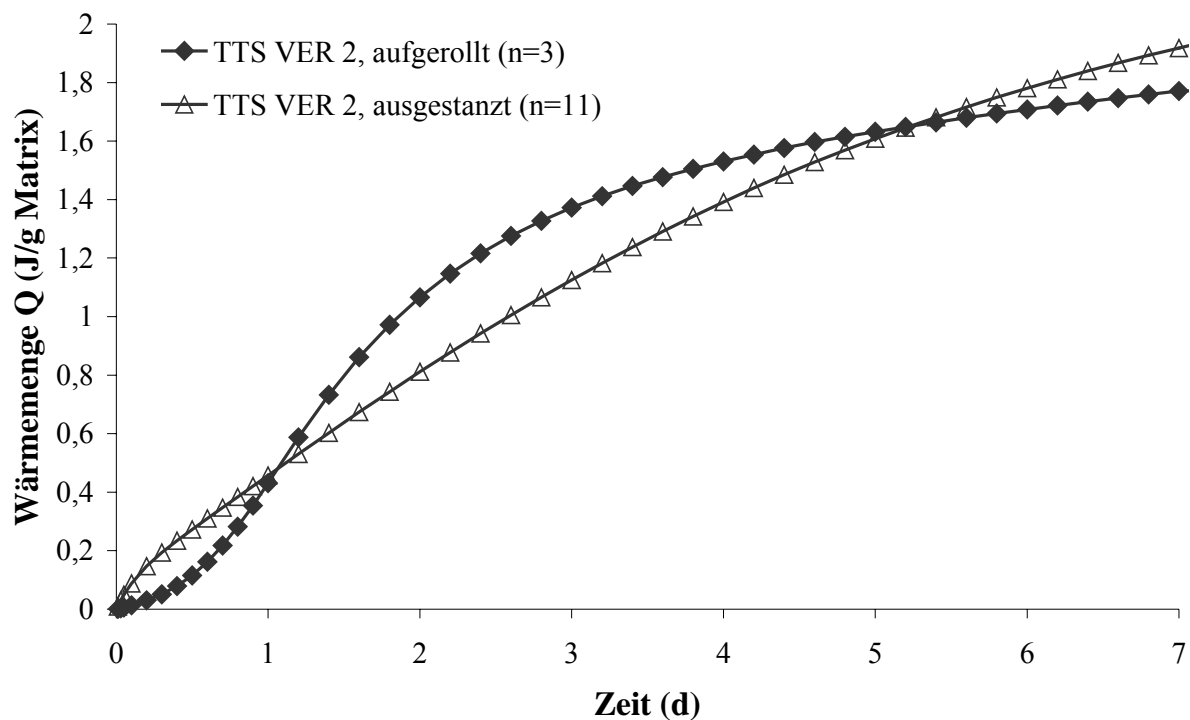


Abb. 11.8. Wärmemenge in Abhängigkeit von der Zeit für ausgestanzte und aufgerollte TTS VER 2 bei 25°C.

Bei den ausgestanzten Laminaten spielte die Kristallkeimbildung im Inneren der Stanzlinge im Verhältnis zur Schnittkantenkristallisation nur eine untergeordnete Rolle. Sie wird als geringes Wärmeleistungsplateau nach einem Tag sichtbar.

In Abb. 11.7 ist ebenfalls die gute Reproduzierbarkeit der mikrokolorimetrischen Messungen dargestellt. Bei den ausgestanzten Laminaten des TTS VER 2 fällt die vergleichsweise hohe Standardabweichung während des ersten Messtages auf. Die Ausstanzeffekte führten also zu Abweichungen im Kristallisationsverhalten zwischen verschiedenen Chargen, während das anschließende Kristallwachstum fast keinen Schwankungen unterlag.

Vergleicht man die freigesetzten Wärmemengen für die ausgestanzten und aufgerollten Lamine in Abhängigkeit von der Zeit, so ergibt sich für die aufgerollten Lamine eine für Kristallisationsvorgänge typische sigmoide Kurve (Abb. 11.8). Wurden die Lamine dagegen ausgestanzt, so entfällt der langsame Kurvenbeginn der Kristallkeimbildung, da diese durch das Ausstanzen bereits induziert wurden. Man erhält eine logarithmische Kurvenform.

### **11.1.5 Einfluss des Einfrierens auf die Kristallisation**

Bei der Probenvorbereitung für die Polarisationsmikroskopie und die Pulverröntgenbeugung wurden die TTS-Lamine für jeweils 15 min auf einem Objektträger eingefroren, um die kristalline Abdeckfolie, die sich störend auf die Untersuchung der Matrix auswirken würde, entfernen zu können. Deshalb sollte der Einfluss des Einfrierens auf den Kristallisationsprozess herausgefunden werden.

Ein TTS-Laminat VER 2 wurde direkt nach der Herstellung für 15 min eingefroren und sofort mikrokalorimetrisch bei 25°C untersucht. Die erhaltene Messkurve unterschied sich nur geringfügig in der Initialphase, die ohnehin den stärksten Schwankungen bei der Messung unterlag, von dem uneingefrorenen Laminat. Die Wärmeflussdifferenz zwischen dem eingefrorenen und dem nicht eingefrorenen TTS betrug nach einem Tag 0,0  $\mu$ W. Mikrokalorimetrisch war durch das kurzzeitige Einfrieren während der Probenvorbereitung keine zusätzliche Kristallisation erfassbar. Durch die mikroskopische Untersuchung war innerhalb von 7 Tagen kein Unterschied in den Kristallformen sowie der Kristalldichte durch das Einfrieren erkennbar.

Da die Mikroskopie und Röntgenbeugung nur eine sehr kurze Zeitspanne von maximal 4 Stunden in Anspruch nahmen, war kein Einfluss des Einfrierens auf die Ergebnisse im Vergleich zu den uneingefrorenen Werten aus der Mikrokalorimetrie zu erwarten.

### **11.1.6 DSC-Analytik**

#### **11.1.6.1 TTS VER 2**

Das flächendeckend kristallisierte TTS VER 2 wurde nach 20 Monaten Lagerzeit bei Raumtemperatur ebenfalls DSC-analytisch bei der Scanningrate von 10°C/min untersucht. In der erhaltenen Kurve konnten keine Schmelzpeaks der kristallisierten Arzneistoffe registriert werden. Die Arzneistoffkristalle lösen sich anscheinend langsam über einen weiten Temperaturbereich in der erweichten Polymermatrix (Lloyd et al. 1997, Lipp & Müller-Fahrnow 1999).

Das TTS PLA 1 zeigte bei einer Temperatur von 89°C einen Phasenübergang. Erweicht die Matrix also unterhalb der Schmelztemperatur der Wirkstoffe, so bildet sich unterhalb der

Schmelzpunkte eine Lösung der Arzneistoffe im Polymer. Die Schwäche der DSC liegt darin, dass thermische Effekte mit geringer Wärmetönung nicht detektiert werden können. Dazu gehören unter anderem Lösungsvorgänge kleiner Mengen von kristalliner Materie. Besonders bei niedrigen Konzentrationen ist der Arzneistoffpeak demnach nicht detektierbar, und wenn er erscheint, ist er breiter als der Schmelzpeak des reinen Arzneistoffs und beginnt schon bei niedrigeren Temperaturen (Lloyd et al. 1997). Die Peaks verbreitern sich durch den Lösungsvorgang so stark, dass sie häufig von der Basislinie nicht zu unterscheiden sind. Man erhält so DSC-Kurven fester Lösungen, die in Wirklichkeit keine sind. Dieses Ergebnis besitzt eine große Bedeutung für feste Dispersionen, bei denen die Abwesenheit des Arzneistoffpeaks oft als Beweis für eine feste Lösung interpretiert wurde.

Die Arzneistoffkonzentration, bei der trotzdem ein Schmelzpeak sichtbar wird, sinkt mit steigender Scanningrate. Durch Erhöhung der Scanningrate kann also unter Umständen kristallines Material in Polymeren erfasst werden. Dies liegt darin begründet, dass weniger Zeit für die Arzneistoffauflösung zur Verfügung steht und der Arzneistoff dadurch stärker kristallin vorliegt. Bei höheren Scanningraten wird folglich eine stärkere Schmelzwärme frei (Lloyd et al. 1997).

Beim Versuch, durch eine Erhöhung der Scanningrate auf 40°C/min Schmelzpeaks der kristallisierten Arzneistoffe in den TTS mithilfe der DSC detektieren zu können, traten bei höheren Heizraten kleine und sehr breite Peaks auf (Abb. 11.9). Dabei stieg die Temperatur des Peakmaximums mit steigender Scanningrate an, während die Onset-Temperatur konstant blieb. Auch die Peakfläche stieg kontinuierlich (Tab. 11.4). Durch Erhöhung der Scanningrate war es also möglich, Kristalle innerhalb einer amorphen Matrix nachzuweisen, die bei niedriger Scanningrate wegen des langsamen Lösungsprozesses nicht detektiert werden konnten.

Um die langsame Auflösung der Arzneistoffkristalle in der Matrix bei Temperaturerhöhung zu bestätigen, wurde ein 3 Monate gelagertes TTS VER 2 bei verschiedenen Temperaturen von 80 bis 150°C für 5 Minuten im Trockenschrank erwärmt und sofort mikroskopiert. Bei Temperaturen über 90°C war zu beobachten, wie sich die Kristalle langsam im Polymer lösen (Abb. 11.10). Bei 150°C, also unterhalb der Schmelztemperatur von E2 und NEA, hatten sich bereits alle Kristalle aufgelöst.



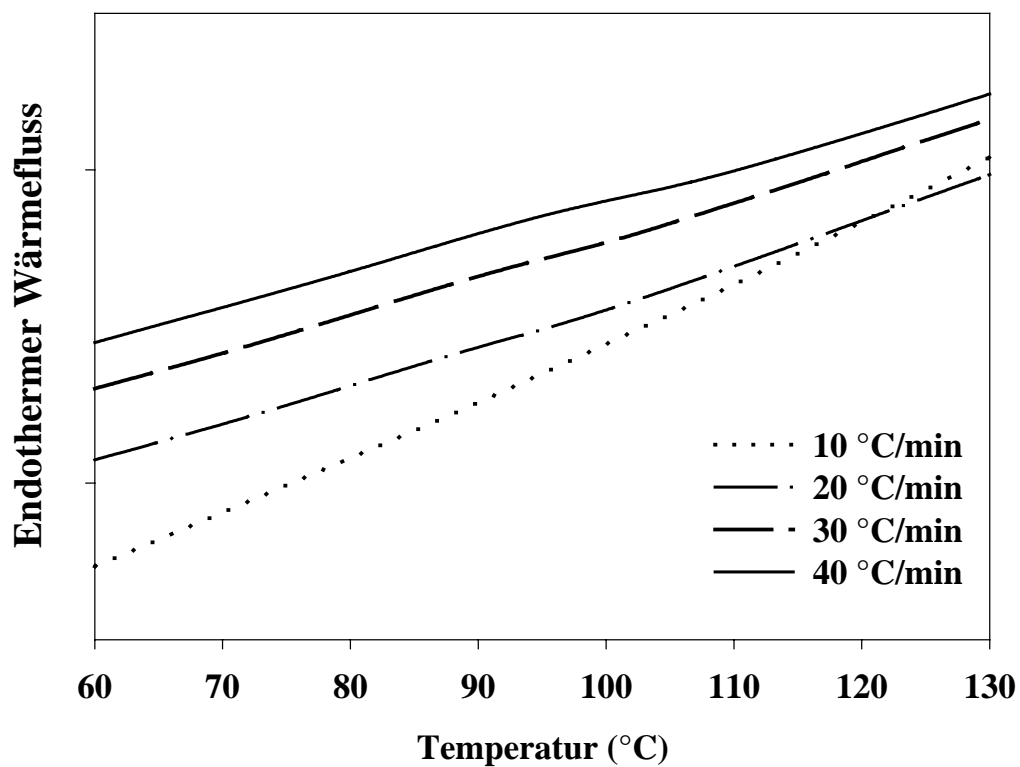


Abb. 11.9. DSC-Kurven des kristallisierten TTS VER 2 nach 20 Monaten bei Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Scanningrate.

Scanningrate	10°C/min	20°C/min	30°C/min	40°C/min
Onset-Temperatur (°C)	-	78,70	75,73	78,62
Peakmaximum (°C)	-	86,13	88,20	93,55
Wärmemenge (J/g)	-	0,05	0,14	0,54

Tab. 11.4. Auswertung der DSC-Peaks der kristallisierten TTS VER 2 nach 20 Monaten bei Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Scanningrate.

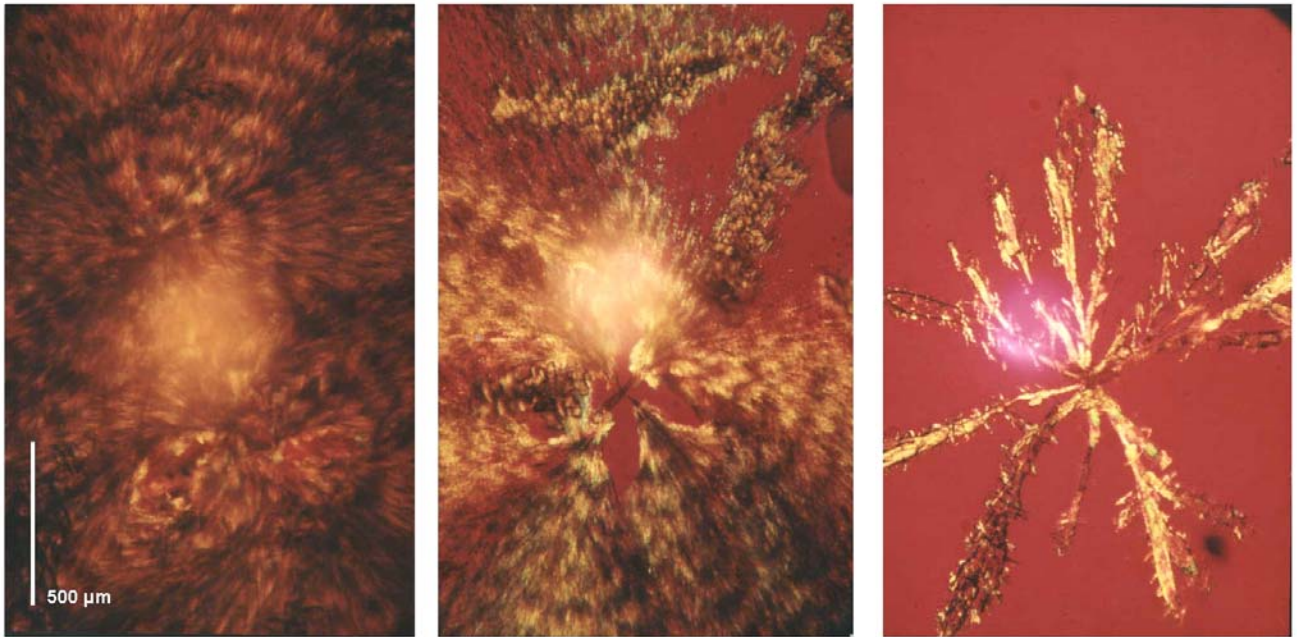


Abb. 11.10. Mikroskopischer Nachweis der Auflösung der Kristalle des TTS VER 2 in der Matrix nach 3-monatiger Lagerung (a) bei Raumtemperatur und nach anschließendem 5-minütigem Erhitzen auf (b) 110°C bzw. (c) 120°C.

Die Zeitdauer des Erwärmens besaß einen Einfluss auf die Kristallauflösung. Längeres Erhitzen führte bereits bei niedrigeren Temperaturen zur Kristallauflösung, was im Zusammenhang mit geringen Heizraten der DSC-Messungen steht, denn auch in der DSC führen hohe Temperaturgradienten zu höheren Schmelztemperaturen in der Matrix.

Die vollständige Auflösung der Kristalle oberhalb der registrierten Phasenübergangstemperatur wurde erneut bestätigt, indem ein kristallisiertes TTS VER 2 bei 80°C bzw. 100°C eingelagert wurde. Während das Laminat bei 80°C nach einer Woche keine Veränderung zum Ausgangszustand zeigte, hatten sich bei 100°C nahezu alle Kristalle aufgelöst. Bei ungefähr 90°C findet also eine sprunghafte Erhöhung der Löslichkeit in der Matrix statt, was auf einem fest-flüssigen Phasenübergang des Polymers beruhen kann.

### 11.1.6.2 TTS VER 4

Auch das höher übersättigte und damit auch stärker kristallisierte TTS VER 4 zeigte einen geringen Schmelzpeak im Bereich zwischen 110 und 120°C (Abb. 11.11), der jedoch quantitativ nicht ausgewertet werden konnte. Die freigegebene Wärmemenge wies mit steigender Scanningrate keinen Anstieg auf (Tab. 11.5). Das Peakmaximum stieg dagegen mit höherer Heizrate, während die Onset-Temperatur annähernd konstant blieb.

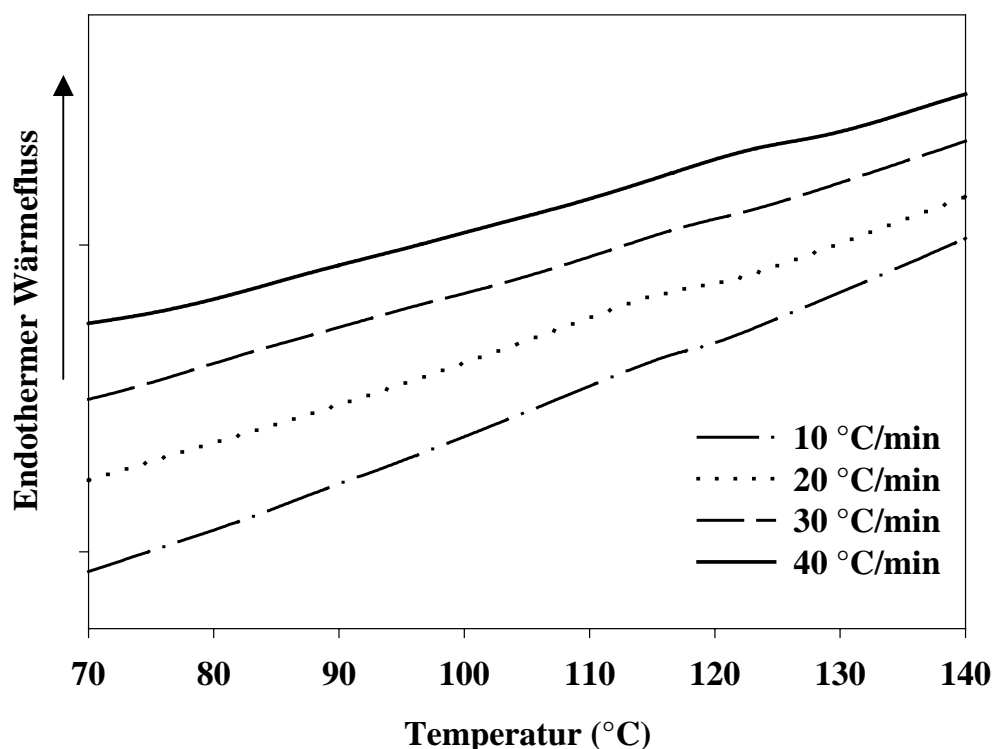


Abb. 11.11. DSC-Kurven des kristallisierten TTS VER 4 nach 8-wöchiger Lagerung bei Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Scanningrate.

Scanningrate	10°C/min	20°C/min	30°C/min	40°C/min
Onset-Temperatur (°C)	105,81	100,44	109,24	110,03
Peakmaximum (°C)	113,66	114,20	115,70	122,06
Wärmemenge (J/g)	0,54	0,80	0,17	0,35

Tab. 11.5. Auswertung der DSC-Peaks der kristallisierten TTS VER 4 nach 8 Wochen bei Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Scanningrate.

Die DSC hat sich für die quantitative Kristallanalytik in der verwendeten Polymermatrix der TTS als nicht geeignet erwiesen. Die Detektion von Kristallen erfolgt erst in sehr hoher Konzentration und mit zu geringer Genauigkeit.

## **11.2 TTS mit einem konstanten Verhältnis zwischen E2-hemihydrat und NEA**

Wie unter Kap. 11.1 beschrieben ist eine Auswertung der experimentellen Daten aus Versuchsreihen mit Laminaten unterschiedlicher Arzneistoffmischungen, d.h. verschiedener Prozentgehalte der Arzneistoffe zueinander, schwierig, weil sich unterschiedliche Kristallstrukturen ausbilden, die verschiedene Beugungsmuster und Kristallisationswärmen besitzen. Diese unterschiedlichen Kristalltypen bzw. deren verschiedene Anteile sind schwer miteinander in Beziehung zu setzen. Um die Analyse zu erleichtern, wurden die Versuche mit einem festen Verhältnis von 1:3 zwischen E2-hemihydrat und NEA fortgesetzt. Nur die Gesamtarzneistoffkonzentration variierte zwischen den untersuchten Laminaten (TTS VER 25 bis VER 31).

Dieser Ansatz sollte in den Laminaten der Messreihe die Ausbildung von Kristallgittern im gleichen Verhältnis zueinander gewährleisten. Alle Beugungsuntersuchungen wiesen ein einheitliches Reflexmuster auf, wobei die absoluten Reflexintensitäten von der Gesamtarzneistoffkonzentration abhängig waren. Veränderungen in der Kristallstruktur sollten nicht auftreten.

Auch bei dieser Wirkstoffmischung im Verhältnis 1:3 traten im Pulverdiagramm der TTS-Lamine die zusätzlichen Reflexe bei  $8,9^\circ$  und  $11,8^\circ$   $2\theta$  auf, die in der aus Ethylacetat auskristallisierten Wirkstoffmischung nicht vorkamen und die auf die Ausbildung einer veränderten Kristallphase zwischen E2 und NEA in der polymeren Matrix schließen lassen (Abb. 11.12).

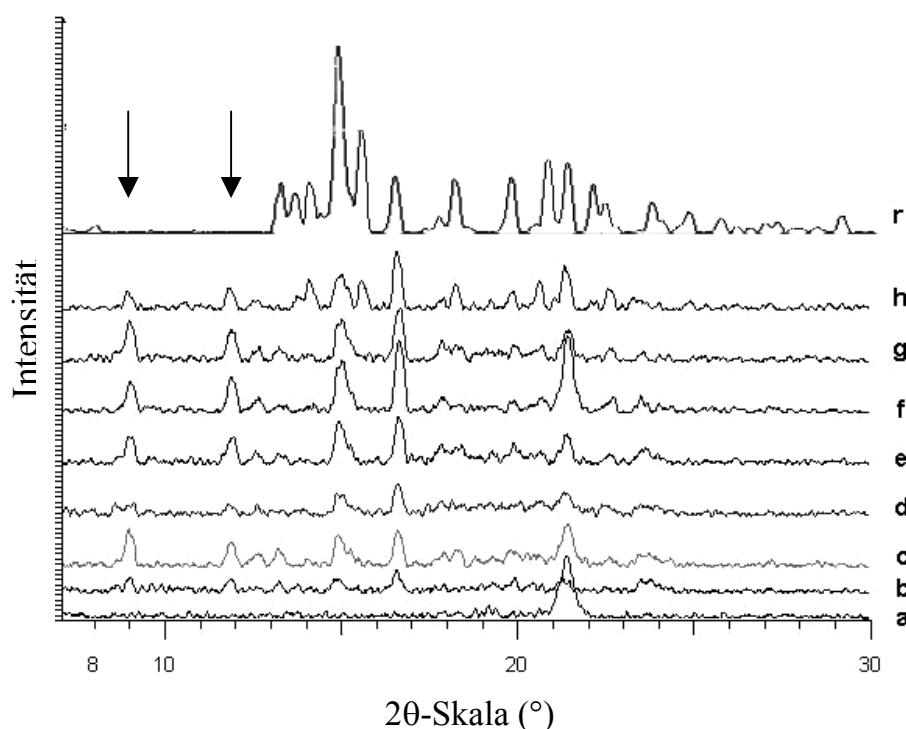


Abb. 11.12. Röntgendiagramm eines 12 %igen TTS-Laminates mit E2/NEA 1:3 nach Lagerung bei Raumtemperatur: (a) 0 Tage, (b) 1 Woche, (c) 2 Wochen, (d) 4 Wochen, (e) 6 Wochen, (f) 8 Wochen, (g) 3 Monate, (h) 4 Monate, (r) E2/NEA-Mischung 1:3 aus Ethylacetat. Der Reflex bei  $21,3^\circ 2\theta$  ist durch die Probenhalterfolie begründet.

Die Abb. 11.13 zeigt die berechnete Netto-Peakfläche der auftretenden Reflexe nach 13 Wochen Lagerung bei Raumtemperatur für verschiedene Arzneistoffgehalte. Die charakteristischen NEA-Reflexe bei  $14,8^\circ$  und  $16,5^\circ 2\theta$  sowie die zusätzlichen Reflexe bei  $8,9^\circ$  und  $11,8^\circ 2\theta$  stiegen proportional in Abhängigkeit von der Gesamtarzneistoffkonzentration an. Nur die charakteristischen Reflexe für E2-hemihydrat zeigten während der Kristallisation keinen Anstieg. Die gemessenen Peakflächen wurden auf die Abszisse extrapoliert. Der Schnittpunkt liegt in einem Bereich von 4 bis 5 % Arzneistoffgehalt, was einem Gehalt von 3,4 % NEA und 1,1 % E2-hemihydrat entspricht. Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit der Sättigungslöslichkeit der beiden Hormone in der polymeren Matrix sowie mit den mikroskopischen Ergebnissen.

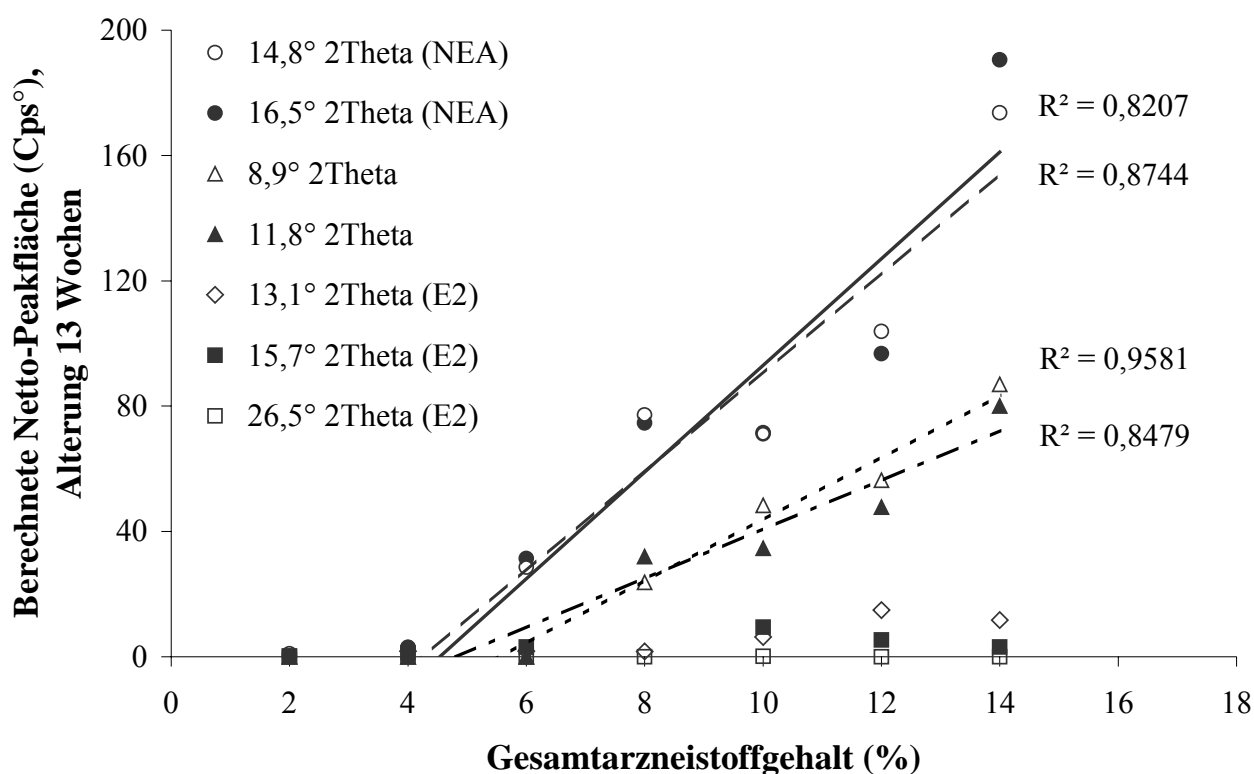


Abb. 11.13. Berechnete Netto-Reflexflächen für die 13-wöchige Lagerung bei Raumtemperatur von TTS mit einem konstanten Verhältnis zwischen E2-hemihydrat/NEA 1:3. Normierung auf ein konstantes Flächengewicht von 100 g/m<sup>2</sup>.

Mithilfe der Polarisationsmikroskopie wurden nach 5 Wochen Lagerung bei Raumtemperatur in den 4 %igen Laminaten die ersten Kristalle beobachtet (Abb. 11.14a). Je höher die Arzneistoffkonzentration war, desto schneller bildeten sich Kristallkeime und bei der Lagerung zeigte sich ein dichter Kristallteppich (Abb. 11.14). Die mikroskopisch beobachteten Kristalle waren hauptsächlich vom federförmigen Typus, selten traten jedoch auch nadelförmige Kristalle des Estradiols auf.

Wurden die Lamine mikrokolorimetrisch untersucht, so ergaben Arzneistoffkonzentrationen von 2 und 4 % einen exothermen Arzneistoff-immanenten Wärmefluss von 0,1  $\mu$ W/g Matrix, der nach 4 Tagen auf Null abgefallen war (Abb. 11.15). Mit steigendem Arzneistoffgehalt war oberhalb einer Konzentration von 4 % ein steigender Arzneistoff-immanenter Wärmefluss detektierbar, was auf den verstärkten Kristallisationsprozess zurückzuführen war und in Übereinstimmung mit den mikroskopischen und röntgendiffraktometrischen Untersuchungen steht.

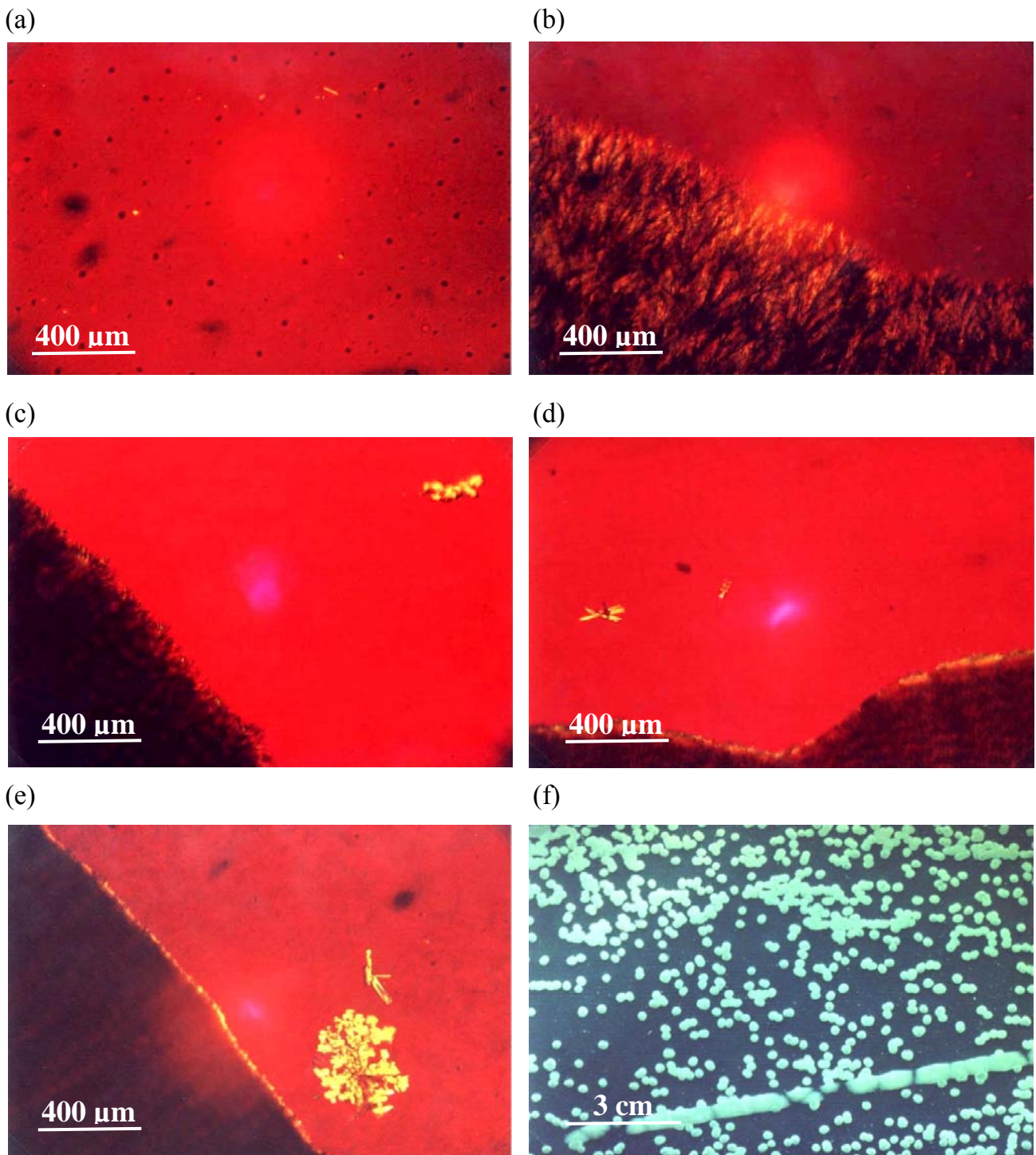


Abb. 11.14. Polarisationsmikroskopie von E2/NEA-haltigen TTS im Verhältnis 1:3 mit steigender Arzneistoffkonzentration nach Lagerung bei Raumtemperatur: (a) 4 % E2/NEA 1:3, 6 Wochen, (b) 6 % E2/NEA 1:3, 4 Wochen, (c) 8 % E2/NEA 1:3, 4 Wochen, (d) 10 % E2/NEA 1:3, 4 Wochen, (e) 12 % E2/NEA 1:3, 4 Wochen und (f) 14 % E2/NEA 1:3, 1 Tag.

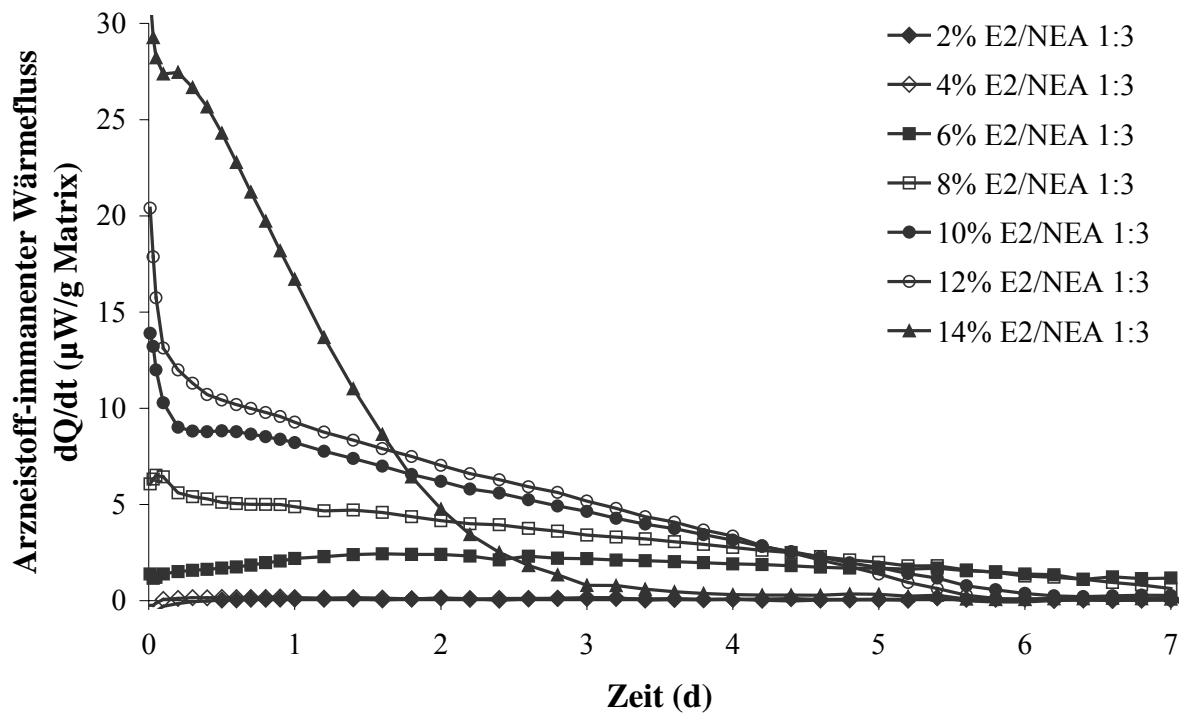


Abb. 11.15. Arzneistoff-immanenter Wärmefluss bei 25°C für TTS mit einem konstanten Verhältnis zwischen E2-hemihydrat/NEA 1:3.

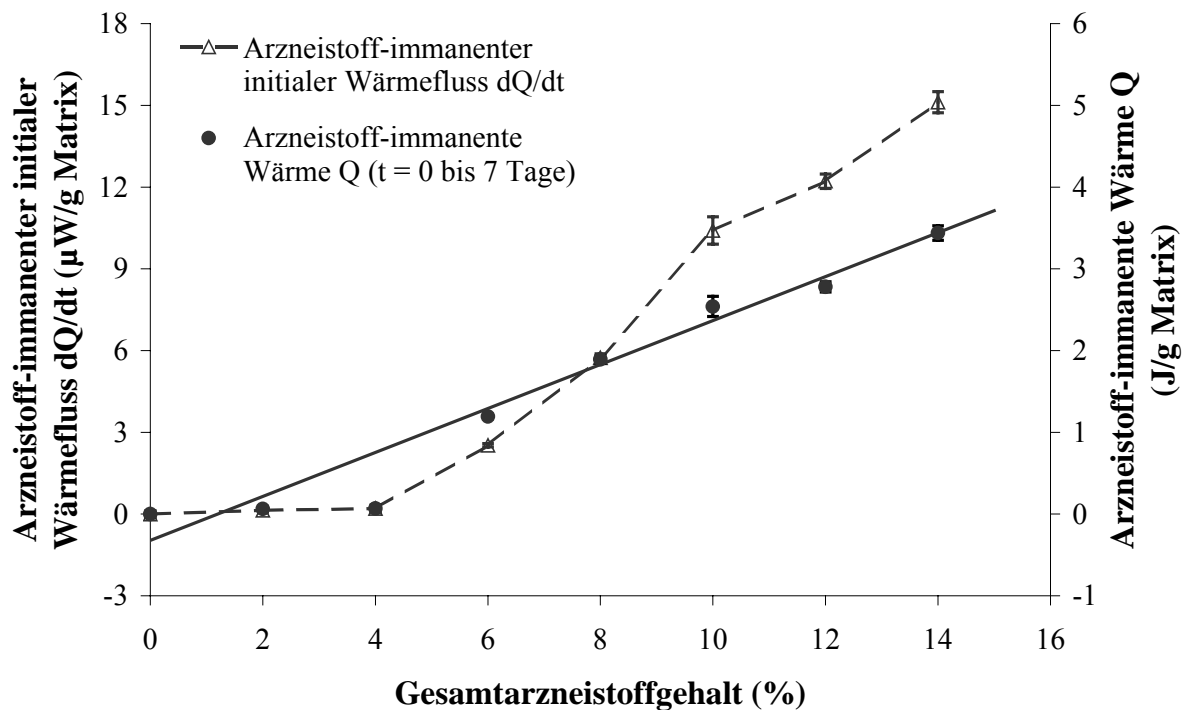


Abb. 11.16. Korrelation zwischen Arzneistoff-immanenter Wärme über 7 Tage und initialem Wärmefluss bei 25°C in Abhängigkeit von der Gesamtarzneistoffkonzentration der TTS mit einem konstanten Verhältnis von E2-hemihydrat/NEA 1:3.



Der Kristallisationsprozess verlief mit steigender Arzneistoffkonzentration beschleunigt und war folglich schneller beendet. Alle Lamine mit Arzneistoffkonzentrationen von  $\geq 8\%$  erreichten ein konstantes Wärmeleistungsplateau von ungefähr  $0,3\text{ }\mu\text{W/g}$  nach der Messzeit von  $\leq 7$  Tagen (Abb. 11.15), was als Ende des Kristallisationsprozesses aufgefasst wird.

Die Mikrokolorimetrie ergab oberhalb von  $4\%$  mit erhöhtem Arzneistoffgehalt einen linear steigenden initialen Wärmeleistungs sowie über die Zeit von 7 Tagen eine linear ansteigende Wärmemenge (Abb. 11.16). Oberhalb der Sättigungskonzentration ergab sich also eine lineare Abhängigkeit zwischen der Arzneistoffkonzentration und der entwickelten Wärme, deren Steigung der Kristallisationsenthalpie entspricht. Die Kristallisationsenthalpie der Mischung aus E2-hemihydrat und NEA im Verhältnis 1:3 betrug  $-7,9 \pm 0,95\text{ kJ/mol}$ . Obwohl die Kristallisationsenthalpien von E2-hemihydrat und auch von NEA mit  $-23,3\text{ kJ/mol}$  bzw.  $-22,8\text{ kJ/mol}$  höher waren als die der Mischung und es sich bei den Einzelkristallen anscheinend um den thermodynamisch stabileren Zustand handelte, war die Bildung der neuen Mischphase kinetisch bevorzugt.

Die mikrokolorimetrische Bestimmung des gesamten Kristallisationsprozesses ermöglicht die direkte Berechnung der kristallisierten Arzneistofffraktion in Abhängigkeit von der Zeit (Abb. 11.17). Die kristallisierte Fraktion wird dazu als proportional zur freigesetzten Wärmemenge angenommen. Die Ausbildung der kristallinen Phase aus einem amorphen Zustand beginnt normalerweise langsam mit der Kristallkeimbildung und ist von einer schnelleren Wachstumsphase mit konstanter Wachstumsrate gefolgt. Der Kristallisationsprozess verlangsamt sich schließlich wieder, wenn die Sättigungslöslichkeit erreicht wird. Die kristallisierte Fraktion als Funktion von der Zeit sollte also eine typische S-förmige Transformationskurve ergeben. Durch das Ausstanzen der Proben wurde jedoch erhebliche Energie zugeführt, welche die Keimbildung förderte, sodass der langsame Kristallisationsbeginn durch diesen Effekt überlagert wurde. Nur das  $6\%$ ige TTS zeigte einen typischen sigmoiden Kurvenverlauf.

Die Halbwertszeit, d.h. die Zeitdauer bis zum Erreichen des halben Kristallisationsgrades, nahm mit steigender Übersättigung ab (Abb. 11.17), denn Kristallkeimbildung und Kristallwachstum verlaufen mit steigender Konzentration beschleunigt (Rodríguez-Hornedo & Wu 1991, Kubota et al. 1997, Rodríguez-Hornedo & Murphy 1999, Schmelzer et al.

1999). Die Kristallisationsgeschwindigkeit hängt also stark vom Grad der Übersättigung ab (Ma et al. 1996, Pudipeddi et al. 1995).

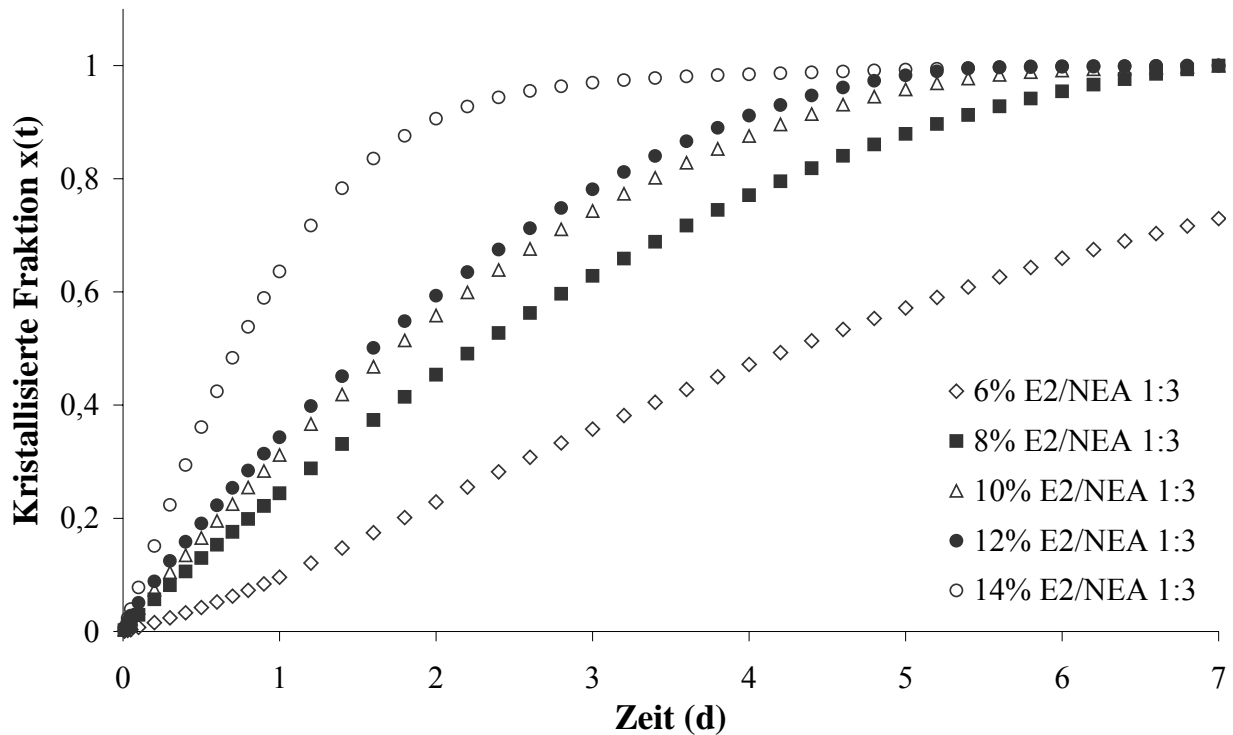


Abb. 11.17. Mikrokalorimetrische Bestimmung des Kristallisationsgrades der TTS mit E2-hemihydrat und NEA im Verhältnis 1:3 in Abhängigkeit von der Zeit bei 25°C.

Abb. 11.18 zeigt die doppelt-logarithmische Avrami-Darstellung der kristallisierten Fraktion mit einer während der Kristallisation ansteigenden Steigung, welche auf eine Veränderung im Kristallisationsmechanismus schließen lässt. Der Beginn der mikrokalorimetrischen Messung war durch eine relativ hohe Zeitkonstante des Gerätes bestimmt. Der Abgleich von gemessener und entwickelter Wärme, d.h. das Erreichen des maximalen Wärmefflusses, benötigte ungefähr 15 min. Diese initiale Messzeit war für die kinetische Auswertung nicht relevant.

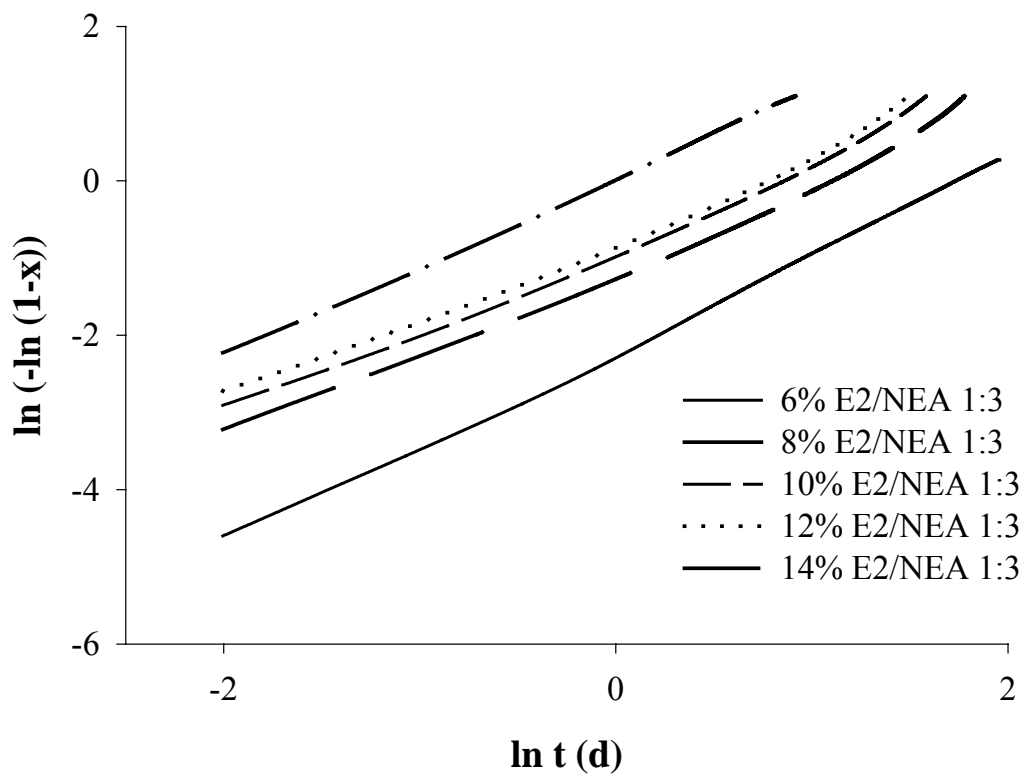


Abb. 11.18. Doppelt-logarithmische Darstellung der Avrami-Gleichung in Abhängigkeit von der Zeit.

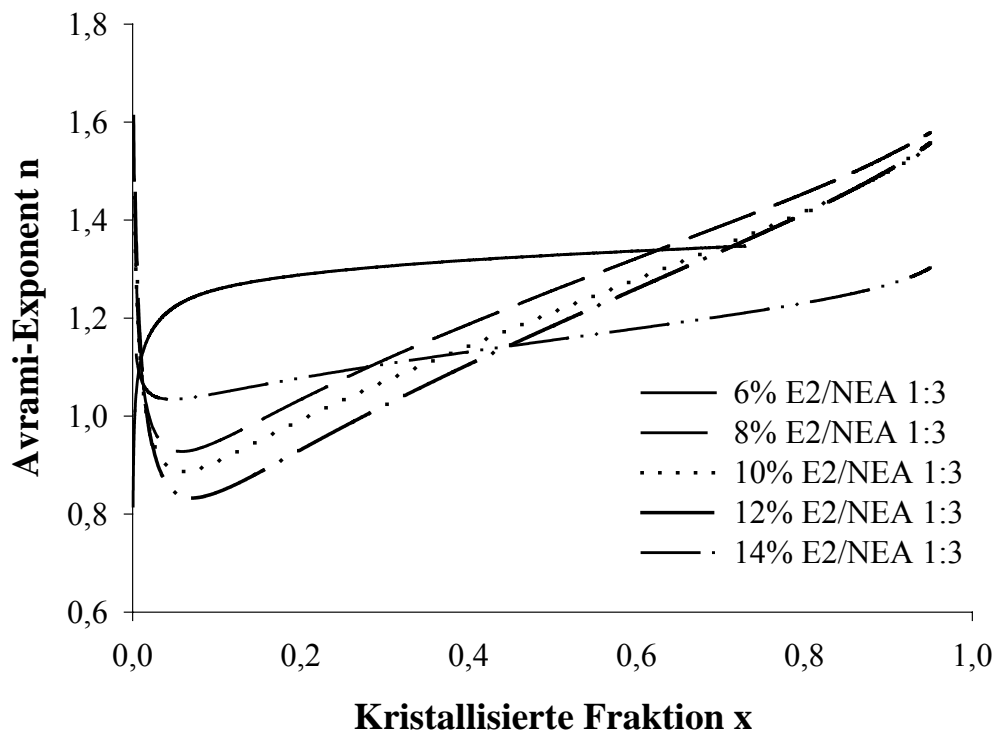


Abb. 11.19. Veränderung des Avrami-Exponenten  $n$  während des Kristallisationsprozesses.

In Abb. 11.19 ist die Abhängigkeit des Avrami-Exponenten  $n$  von der kristallisierten Arzneistofffraktion  $x(t)$  dargestellt. Der Avrami-Exponent steigt während des Kristallisationsprozesses langsam von 1 auf 1,5 an. Dieser Anstieg vollzieht sich nahezu unabhängig von der enthaltenen Arzneistoffkonzentration. Die polymere Matrix stellt durch ihre hohe Viskosität eine starke Diffusionsbarriere für die Arzneistoffmoleküle zu den Kristallkeimen dar. Ein diffusionskontrolliertes Kristallwachstum ist wahrscheinlich, was durch die asymmetrische Form der Wärmeflusskurven bestätigt wird (Pradell et al. 1998, Kotiyan & Vavia 2001). Nimmt man des Weiteren wegen der dominierenden nadelförmigen Kristallform ein eindimensionales Wachstum an, so kann der steigende Avrami-Exponent  $n$  durch eine steigende Keimbildungsrate während des Kristallisationsprozesses erklärt werden. Da durch das Ausstanzen eine starke Kristallkeimbildung initiiert wird, ist während der ersten Zeit das Kristallwachstum der vorhandenen Kristallkeime der vorherrschende Prozess. Die Wachstumsgeschwindigkeit sinkt allerdings bei diffusionskontrolliertem Wachstum im Allgemeinen mit längerer Prozessdauer, da sich die Diffusionsprofile der benachbarten Kristallkeime überlappen (Pradell et al. 1998). Wegen der starken physikalischen Instabilität der hoch übersättigten Systeme findet weiterhin Kristallkeimbildung statt. Das Verhältnis zwischen Kristallwachstum und Keimbildung verschiebt sich in Richtung Keimbildung, was den steigenden Avrami-Exponenten während des Kristallisationsprozesses erklären kann. Die wirklichen Werte für den Avrami-Exponenten  $n$  werden stets am Ende des Kristallisationsprozesses erreicht (Weinberg & Birnie 1996). Ein Wert von 1,5 steht für eine kontinuierliche Kristallkeimbildung bei diffusionskontrolliertem Kristallwachstum.

Bei der Darstellung von  $\ln(-\ln(1-x))$  gegen  $\ln t$  entspricht der Schnittpunkt der Gerade mit der Ordinate dem Wert  $\ln k$ . Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten  $k$  [ $\text{Zeit}^{-n}$ ] sind jedoch wegen der Abhängigkeit vom Avrami-Exponenten  $n$  nicht miteinander vergleichbar. Deshalb wurde die Geschwindigkeitskonstante  $k$  in die Einheit  $[1/\text{Zeit}]$  überführt (Gl. 46). Die Geschwindigkeitskonstante  $k^*$  ist ab einem Kristallisationsgrad von 0,3 nahezu konstant (Abb. 11.20). Mit erhöhter Übersättigung steigt sie wegen der hohen thermodynamischen Aktivität der übersättigten Systeme an. Dabei ist die Kristallisationsgeschwindigkeitskonstante durch die Zugabe von E2-hemihydrat im Vergleich zum reinen NEA stark erhöht.

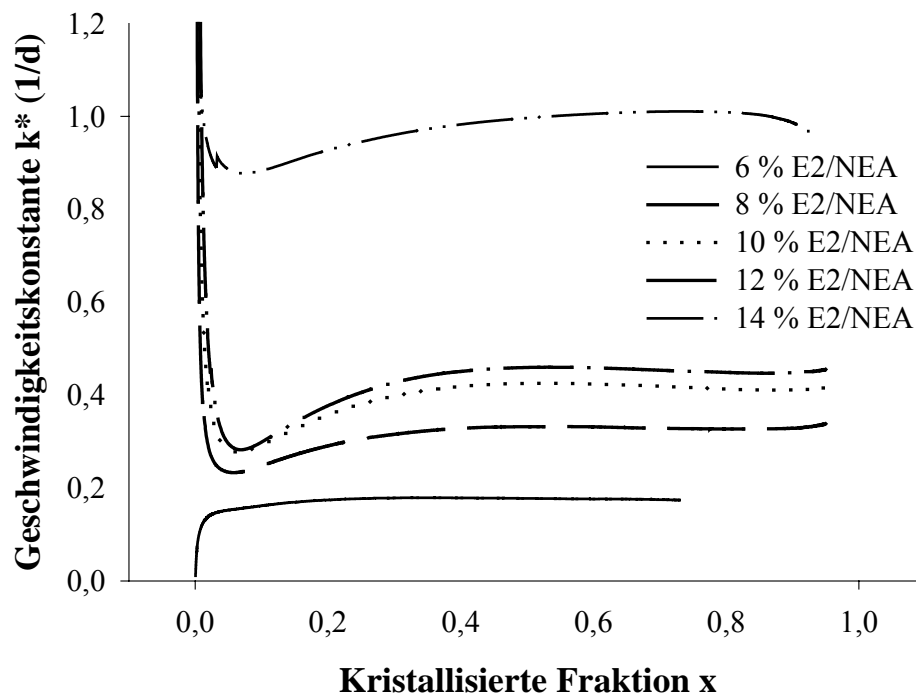


Abb. 11.20. Kristallisationsgeschwindigkeitskonstante  $k^*$  von E2/NEA-TTS im Verhältnis 1:3 während des Kristallisationsprozesses.

## 12 Methoden zur Stabilisierung von TTS

Die Lagerung bei Raumtemperatur war mit einer hohen Kristallisationsneigung der untersuchten übersättigten E2- und NEA-haltigen Lamine verbunden. Um eine konstante Arzneistofffreigabe während der Alterung zu gewährleisten, muss die Stabilität durch Verhinderung des Kristallisationsprozesses erhöht werden.

### 12.1 Stabilisierung der TTS durch eine Vorbehandlung bei 80°C

Die Kristallisation ist durch die Diffusion der Arzneistoffmoleküle zu den Kristallkeimen kontrolliert und damit temperaturabhängig, da eine Temperaturerhöhung die Viskosität des Polymers erniedrigt und damit die Mobilität der Arzneistoffmoleküle erhöht (Laarhoven et al. 2002). Hohe Temperaturen können also die Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle steigern, was eine verstärkte Kristallisation zur Folge haben kann.

Weiterhin ist bekannt, dass E2-haltige TTS durch eine Verringerung des Wassergehaltes gegen Kristallisationsprozesse stabilisiert werden können (Lipp & Müller-Fahrnow 1999). Ein hoher Wassergehalt in der polymeren Matrix fördert wegen der sehr geringen Wasserlöslichkeit im Bereich von 0,2 bis 5 µg/ml bei 25°C die E2-Kristallisation (Kabasakalian et al. 1966, Lundberg 1979, Kotiyan & Vavia 2001). Higuchi et al. (1979) beschrieben für NEA ebenfalls eine sehr geringe Wasserlöslichkeit von 6 µg/ml. Die Trocknung der Lamine bei erhöhter Temperatur ermöglicht eine Verringerung des Wassergehaltes.

Es wurden Untersuchungen durchgeführt, um den Einfluss einer Vorbehandlung bei 80°C auf den Kristallisationsprozess bei Raumtemperatur zu ermitteln. Lamine mit 1,5 % E2-hemihydrat und 8,7 % NEA wurden 7 Tage bei 80°C gelagert und der anschließende Kristallisationsprozess bei Raumtemperatur untersucht (Abb. 12.1). Nach dieser einwöchigen Vorbehandlung war eine bemerkenswerte Stabilisierung der amorphen Arzneistoffe in den Laminen bei Raumtemperatur zu beobachten. Im Vergleich zu den unvorbehandelten Laminen traten wesentlich weniger Kristallisationsbereiche nach 2 Wochen auf (Abb. 12.1a-b). Zusätzlich zu der Abnahme der Kristallmenge wurde

polarisationsmikroskopisch eine Veränderung in den Kristallformen registriert (Abb. 12.1c-d). Die Nadeln, welche sich gebildet hatten, waren gezackt. Stefano et al. (1997) fanden ebenfalls in Abhängigkeit von den Trocknungsbedingungen verschiedene Kristallisationsgrade und Kristallformen. Sie stellten fest, dass die Unterschiede nicht durch die Gegenwart von Restlösungsmitteln verursacht wurden, weil die Matrices, die unter verschiedenen Bedingungen getrocknet wurden, gleiche Mengen an Restlösungsmittel enthielten.

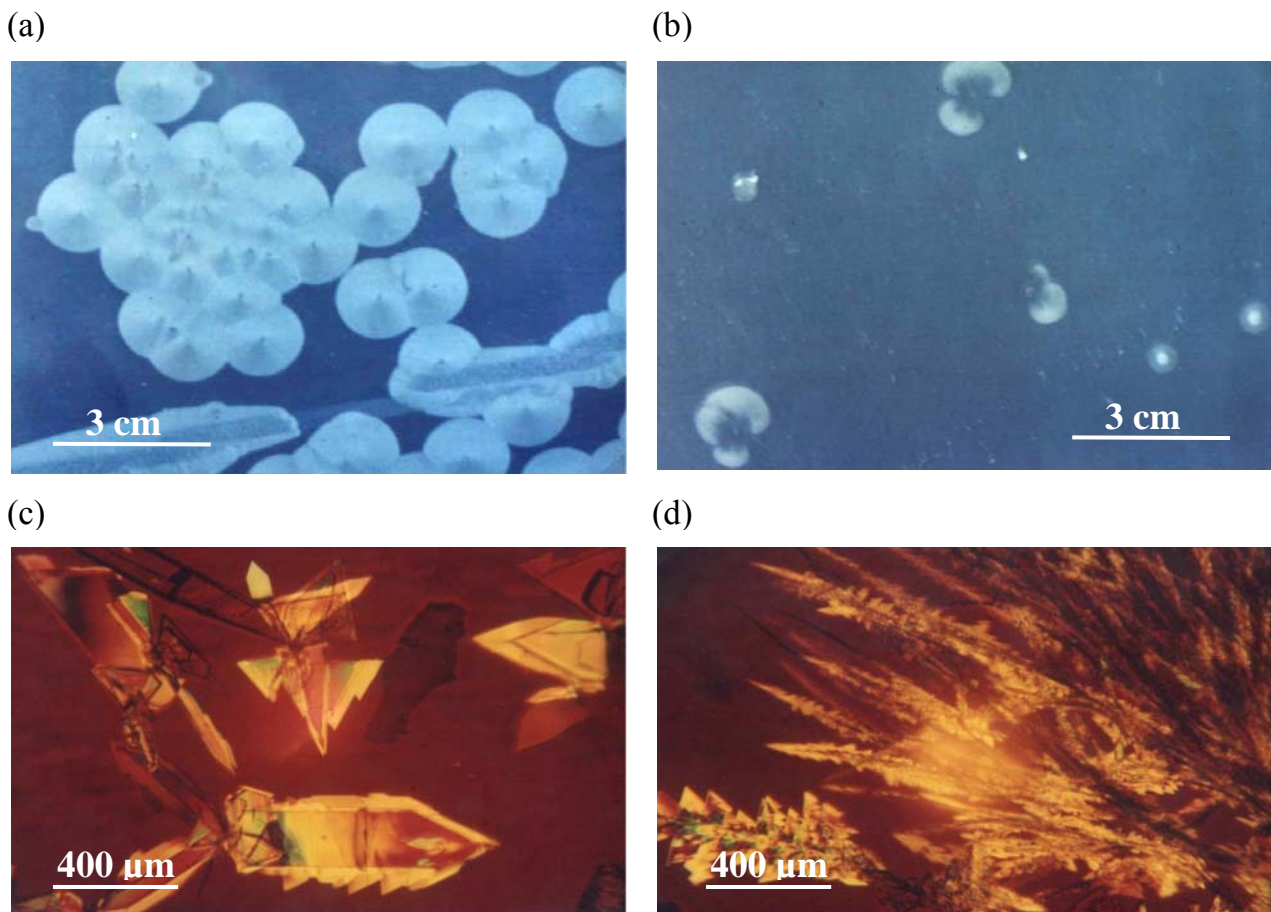


Abb. 12.1. Kristallisation von TTS mit 8,7 % NEA und 1,5 % E2-hemihydrat: (a) 2-wöchige Lagerung bei Raumtemperatur ohne Vorbehandlung bzw. (b) mit einwöchiger Vorbehandlung bei 80°C. (c-d) Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Bereichen des gleichen Laminates, das 1 Woche bei 80°C vorbehandelt und anschließend 4 Wochen bei Raumtemperatur gelagert wurde.

Die 8-wöchige Lagerung bei 80°C führte zur Ausbildung von kleinen, mikroskopisch sichtbaren Kristallen, denn die Löslichkeit der Arzneistoffe in der Matrix war bei 80°C gegenüber 25°C stark erhöht. Aber auch die anschließende Lagerung bei Raumtemperatur zeigte nur eine geringe Kristallisationsneigung. Es wurden wenige kleine, sternförmige Kristalle beobachtet. Große Kristallfedern, wie sie sich in den nicht vorbehandelten Laminaten bildeten, konnten nicht verzeichnet werden. Das Tempern bei 80°C könnte zur Ausbildung einer lagerstabilen festen Dispersion geführt haben.

Nach einer Lagerzeit von 21 Monaten bei Raumtemperatur zeigte der mikroskopische Vergleich der eine Woche bei 80°C vorbehandelten Lamine mit den nicht vorbehandelten Laminaten jedoch keinen Unterschied in der Kristallbildung mehr. Ein dichter Kristallteppich hatte beide Pflaster überzogen. Nur die 8-wöchige Lagerung bei 80°C reduzierte die Kristallbildung während der Langzeitlagerung signifikant.

Die Ergebnisse wurden mittels Pulverröntgenbeugung quantitativ überprüft. Dabei ergab sich, dass die Mehrzahl der analysierten Reflexflächen durch eine verlängerte Vorbehandlung bei 80°C stark abnahm (Abb. 12.2). Der Reflex bei  $14,8^\circ 2\theta$  änderte seine Intensität nicht, während der bei  $16,5^\circ 2\theta$  stark abnahm. Die durchschnittliche Peakflächenreduktion der betrachteten Reflexe nach einer Lagerzeit von 21 Monaten bei Raumtemperatur betrug 30 % nach einwöchiger Vorbehandlung bei 80°C und 50 % nach 8-wöchiger Vorbehandlungszeit. Schlussfolgernd bleibt festzuhalten, dass auch die einwöchige Lagerung bei 80°C einen geringen inhibitorischen Langzeiteffekt auf den Kristallisationsprozess in den untersuchten Laminaten bei Raumtemperatur besaß.

Der Kristallisationsprozess in den bei 80°C vorbehandelten Laminaten wurde auch mithilfe der Mikrokolorimetrie verfolgt. In Übereinstimmung mit den erhaltenen mikroskopischen Ergebnissen wurde, je länger die Proben bei 80°C vorbehandelt waren, eine abnehmende Wärmemenge und damit auch Kristallisation bei 25°C über 7 Tagen gemessen (Abb. 12.3). Die geringste Kristallisationswärme wurde in den Laminaten nach einer 8-wöchigen Lagerung bei 80°C gemessen. Aber bereits die einwöchige Vorbehandlung zeigte einen Effekt, besonders in den Laminaten, die vor der 80°C-Lagerung ausgestanzt wurden. Die Kristallkeiminduktion durch Ausstanzen wurde also durch die Vorbehandlung wirksam unterdrückt, während die nicht ausgestanzt gelagerten Lamine fast keine Stabilisierung



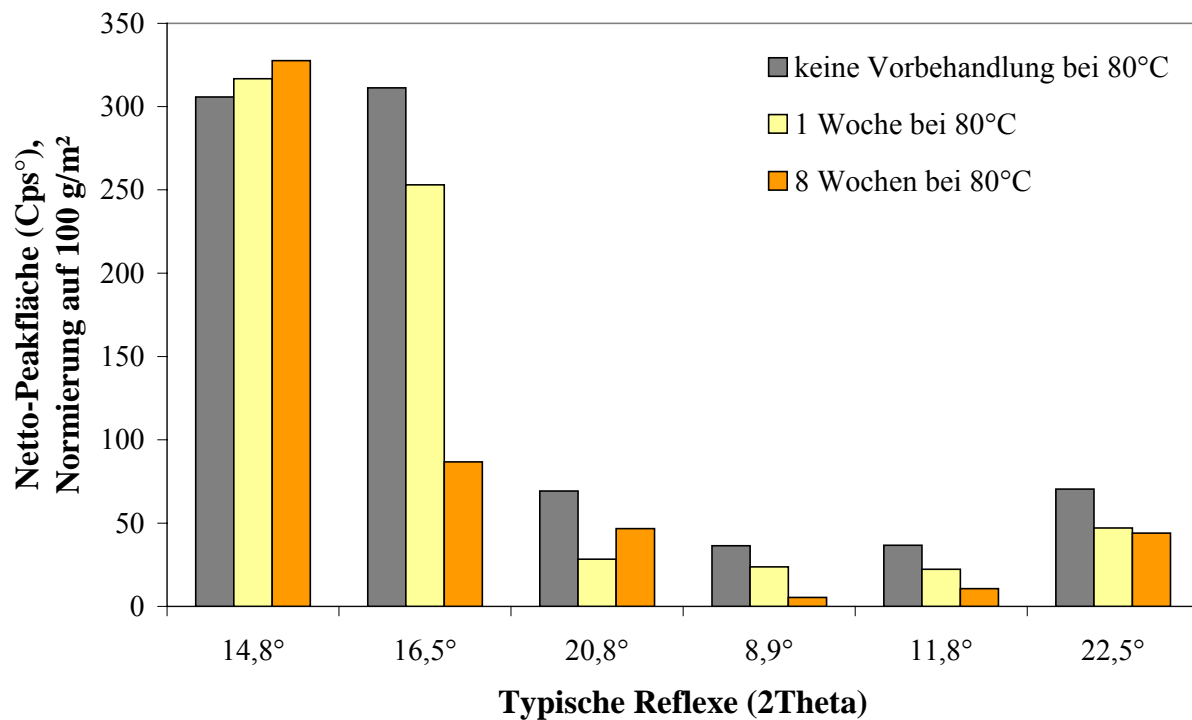


Abb. 12.2. Röntgendiffraktometrische Ergebnisse der bei 80°C vorbehandelten Lamine nach einer Lagerzeit von 21 Monaten bei Raumtemperatur. Normierung auf ein Flächengewicht von 100 g/m².

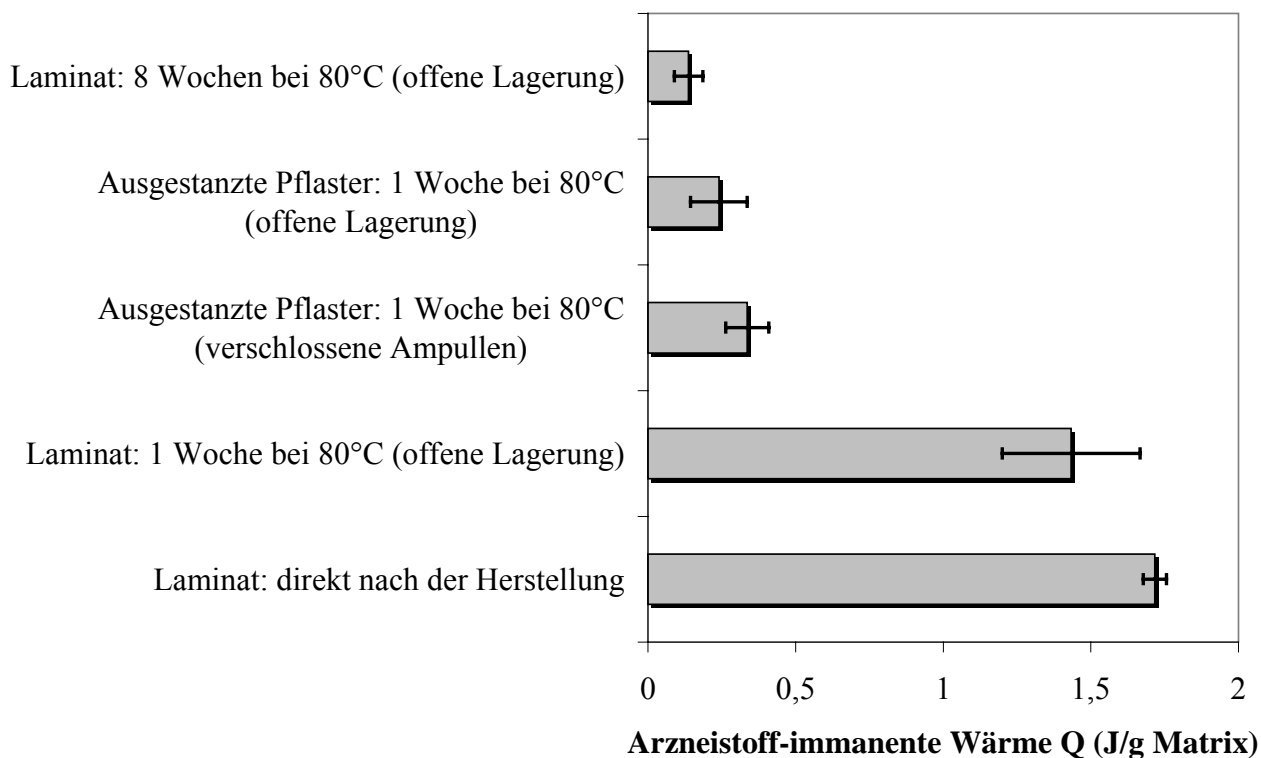


Abb. 12.3. Mikrokalorimetrische Wärme der vorbehandelten TTS mit 1,5 % E2-hemihydrat und 8,7 % NEA über 7 Tage bei 25°C.

zeigten. Die Stabilisierung der Lamine gegen Kristallisationsvorgänge war des Weiteren durch die offene Lagerung der Stanzlinge bei 80°C erhöht, was die Wasserverdunstung ermöglichte. Die Vorbehandlung bei 80°C in verschlossenen Ampullen war weniger effektiv, da die Verdunstung hier verhindert wurde.

## 12.2 Effekt von Zusatzstoffen auf die Kristallisation

Die Kristallisation kann ebenfalls durch den Zusatz verschiedener Hilfsstoffe verändert werden (Ma et al. 1996, Kotiyan & Vavia 2001, Kim & Choi 2002). Die Dauer für die Bestimmung der Kristallbildung mittels Mikroskopie kann sehr lang sein. Häufig sind Beobachtungszeiträume von bis zu 10 Monaten nötig, um eine zuverlässige Aussage über die Stabilität machen zu können. Mithilfe der Mikrokalorimetrie konnte die Arzneistoff-immanente Kristallisationswärme schon nach wenigen Tagen zuverlässig detektiert werden. Die gemessene Wärmemenge stieg bei verstärkter Kristallisation deutlich an.

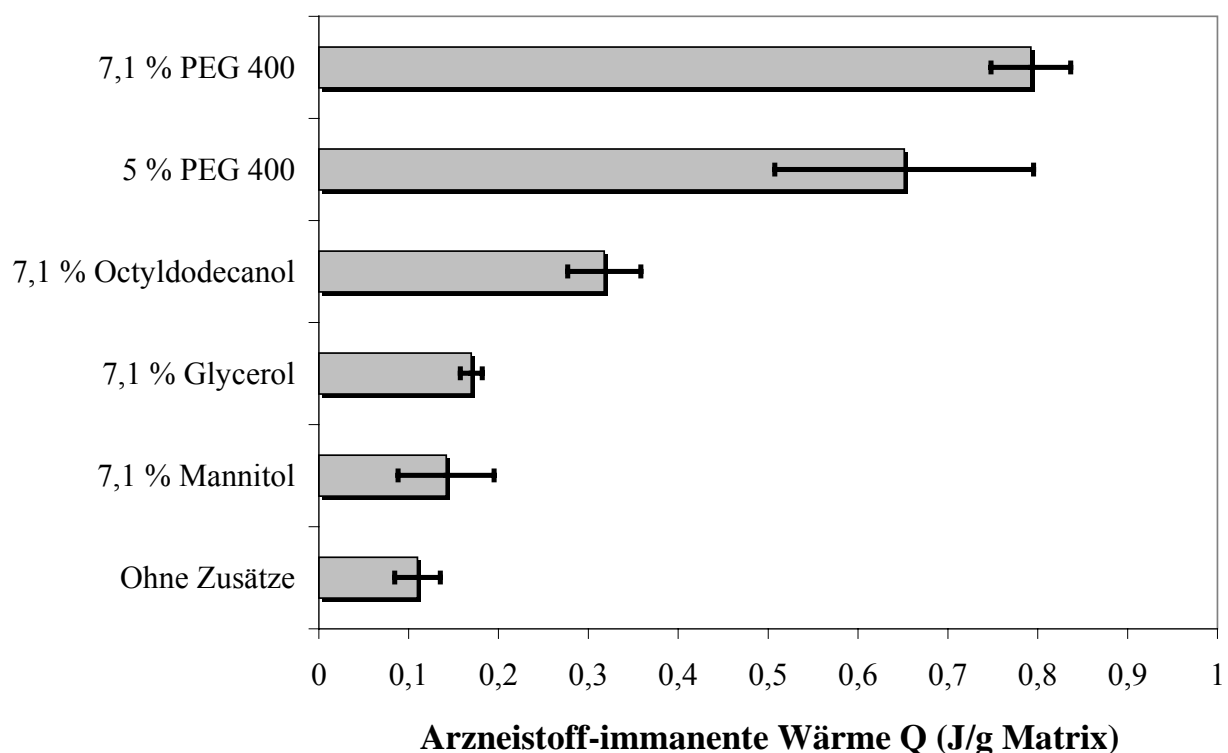


Abb. 12.4. Mikrokalorimetrische Messung der Kristallisation in TTS mit 0,75 % E2-hemihydrat und 8,7 % NEA unter Zugabe verschiedener Hilfsstoffe, welche als Kristallisationsinitiatoren wirkten (25°C).

Lamine mit 0,75 % E2-hemihydrat, 8,7 % NEA und verschiedenen Hilfsstoffen in der polymeren Matrix wurden über 7 Tage mikrokolorimetrisch untersucht (Abb. 12.4). Unter den ausgewählten, hydrophilen Additiven war PEG 400 der stärkste Kristallisationsinitiator. Ein erhöhter PEG 400-Gehalt führte zu einer ausgeprägteren Kristallisation. Die Einordnung der Hilfsstoffe nach ihrer Fähigkeit, die Kristallisation von NEA und E2-hemihydrat zu fördern, erfolgte in der Reihenfolge Mannitol < Glycerol < 2-Octyldodecanol < PEG 400.

Die mikroskopische Beobachtung der verschiedenen Lamine über ein Jahr bei Raumtemperatur bestätigte die Ergebnisse aus der Mikrokolorimetrie. Die PEG 400-haltigen Lamine zeigten die kürzeste Induktionszeit für die Kristallbildung und den dichtesten Kristallteppich (Tab. 12.1 und Abb. 12.5), wohingegen in den Octyldodecanol-haltigen Laminen wesentlich weniger Kristalle gebildet wurden. Das TTS-Laminat ohne weitere Zusätze zeigte annähernd das gleiche Kristallisationsverhalten wie die Lamine mit Mannitol und Glycerol. Mannitol konnte im Polymer nicht vollständig gelöst, sondern teilweise nur dispergiert werden. Im Mannitol-haltigen TTS (Abb. 12.5a) waren deshalb Kristalle zu erkennen, die vom ungelösten, kristallinen Mannitol in der Matrix stammten und nicht auf eine Wirkstoffkristallisation zurückzuführen waren.

Zusatzstoffe	Mikroskopische Kristallinduktionszeiten
Mannitol	> 12 Wochen
Glycerol	6 Wochen
keine	6 Wochen
2-Octyldodecanol	2 Wochen
PEG 400	1 Woche

Tab. 12.1. Mikroskopisch bestimmte Induktionszeiten für die Kristallisation in TTS mit 0,75 % E2-hemihydrat und 8,7 % NEA nach Zugabe von 7,1 % verschiedener Hilfsstoffe.

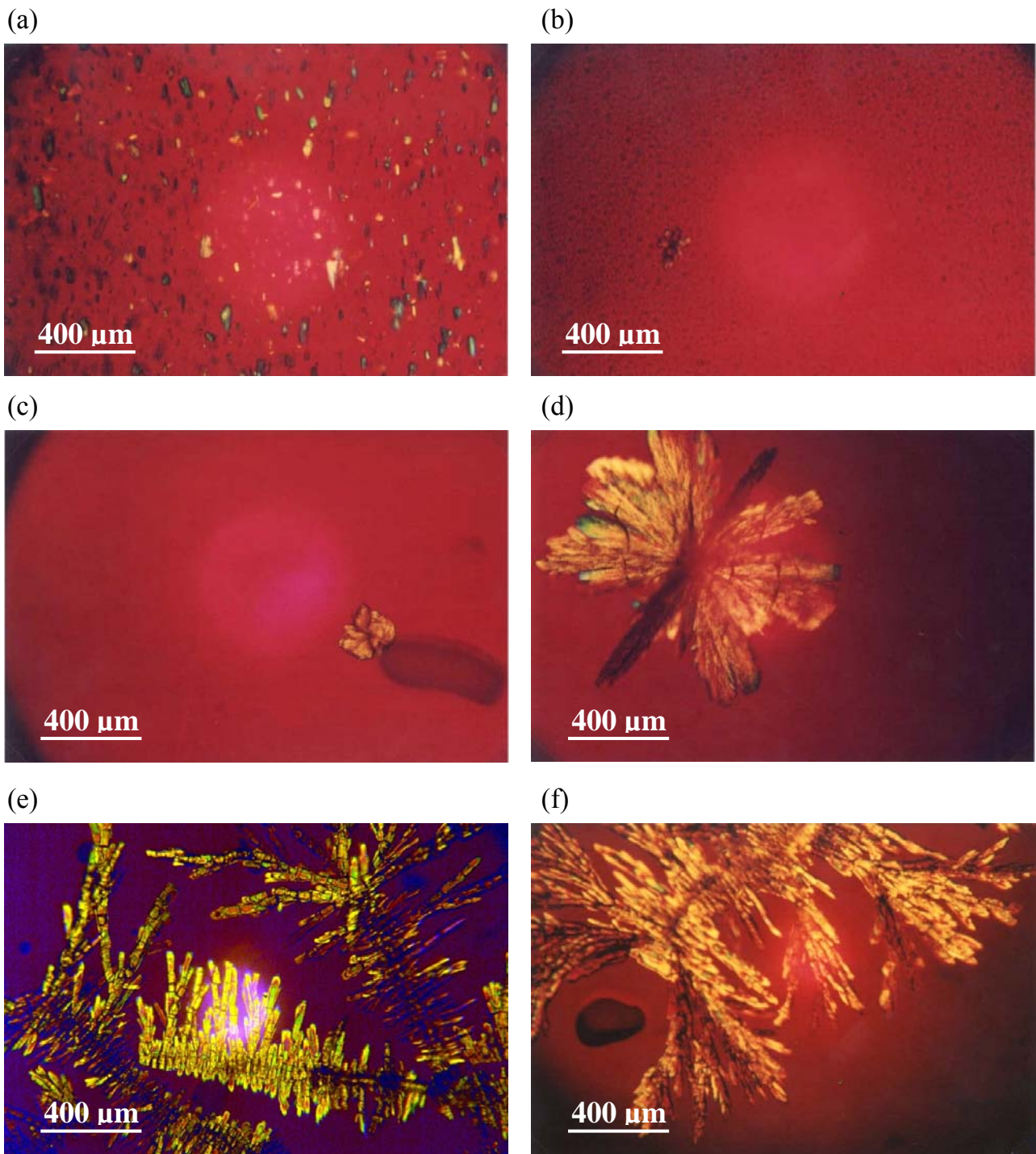


Abb. 12.5. Polarisationsmikroskopie der TTS mit 8,7 % NEA und 0,75 % E2-hemihydrat bei Zugabe verschiedener Hilfsstoffe nach Lagerung bei Raumtemperatur: (a) 7,1 % Mannitol, 8 Wochen, (b) 7,1 % Glycerol, 6 Wochen, (c) ohne Zusätze, 8 Wochen, (d) 7,1 % Octyldodecanol, 8 Wochen, (e) 5 % PEG 400, 3 Monate und (f) 7,1 % PEG 400, 8 Wochen.

## 13 Instabilität durch Zersetzung

Die Instabilität von TTS ist nicht ausschließlich auf Kristallisationsvorgänge beschränkt, sondern auch chemische Zersetzungsreaktionen können die Konzentration des Arzneistoffs während der Lagerung reduzieren. Beide Prozesse sind mit einer Wärmeentwicklung verbunden und können mithilfe der Mikrokolorimetrie detektiert werden, wobei eine Unterscheidung in die einzelnen Prozesse nicht möglich ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Ausmaß der Zersetzungsreaktionen bestimmt werden, um einen Einfluss auf die mikrokolorimetrische Messung auszuschließen. Es wurde festgestellt, dass man durch Vorbehandlung der TTS-Lamine bei 80°C stabilere Systeme erreicht, die nicht so stark kristallisieren wie die ausschließlich bei Raumtemperatur gelagerten Systeme. Eine praktische Anwendung dieses Temperns könnte jedoch durch die verstärkte Zersetzung der Wirkstoffe bei 80°C begrenzt sein. Mit der Erhöhung der Lagertemperatur steigt nämlich auch die Geschwindigkeit von Zersetzungsreaktionen und damit die Menge der Zersetzungsprodukte. Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  ist von der Aktivierungsenergie  $E^*$  und der absoluten Temperatur  $T$  abhängig (Arrhenius-Gleichung Gl. 18).

Als Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses der Zersetzung auf die mikrokolorimetrische Messung bei 25°C sowie die Stabilisierung bei 80°C wurde das TTS VER 2 verwendet. Die Zersetzung wurde sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 80°C bestimmt.

### 13.1 Zersetzung von NEA

Über die Lagerdauer traten in den HPLC-Chromatogrammen bei 245 nm höhere Peaks der Zersetzungsprodukte auf (Abb. 13.1). Nach 10 bzw. 12 Monaten Lagerung bei Raumtemperatur ließ sich ein deutlicher Anstieg der NEA-Zersetzungsprodukte nachweisen, die sich durchschnittlich verdoppelten (Tab. 13.1 und Abb. 13.2). Jedoch betrug die maximale jährliche Zersetzung zu 6 $\beta$ -Hydroxynorethisteronacetat nur 0,2 %. Da die mikrokolorimetrischen Messungen bei 25°C durchgeführt wurden, war kein Einfluss der

Zersetzungsreaktionen auf den gemessenen Arzneistoff-immanenten Wärmefluss zu erwarten.

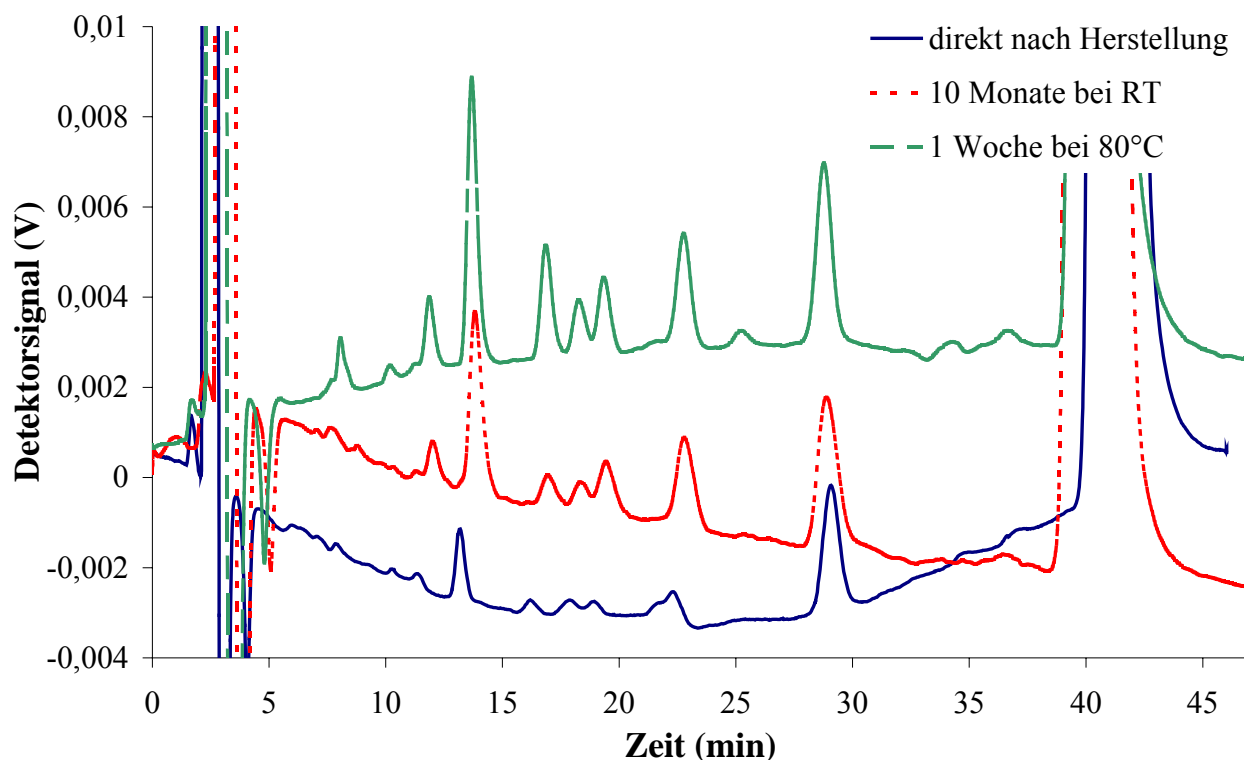


Abb. 13.1. Exemplarische HPLC-Chromatogramme des TTS VER 2 für die Zersetzung von NEA bei 245 nm unter verschiedenen Lagerbedingungen.

Lagerbedin- gungen	NEA- Stamm- lösung	0 Tage RT	4 Tage Objekt- träger	10 Monate RT	12 Monate RT	1 Woche 80°C	8 Wochen 80°C
Nordion	0,010	0,012	0,021	0,030	0,033	0,069	0,269
6 $\alpha$ -Hydroxy- NEA	0,030	0,029	0,037	0,051	0,068	0,178	0,737
6 $\beta$ -Hydroxy- NEA	0,160	0,127	0,152	0,306	0,338	0,452	2,633
Norethisteron	0,010	0,012	0,053	0,062	0,073	0,078	0,290

Tab. 13.1. NEA-Zersetzungsprodukte (%) bei 245 nm für ein TTS VER 2.

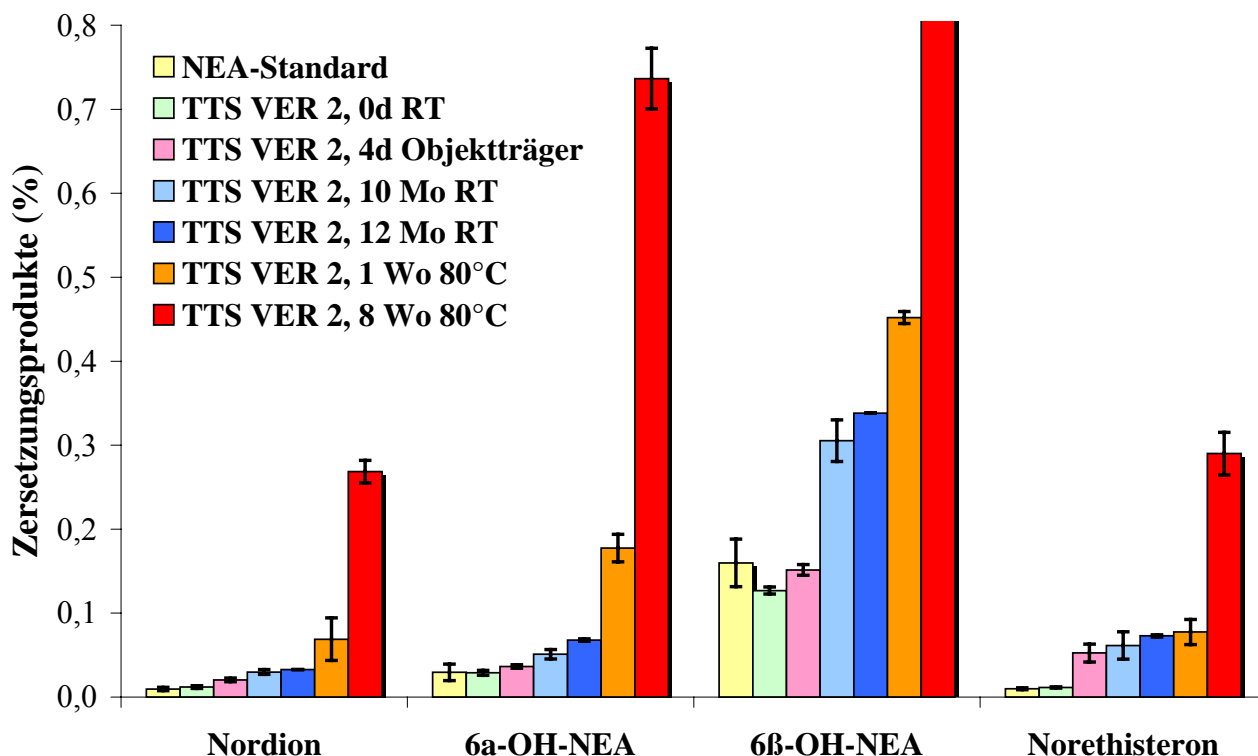


Abb. 13.2. NEA-Zersetzungsprodukte bei 245 nm nach Lagerung bei Raumtemperatur bzw. bei 80°C.

Bei 80°C konnte man nach einer Woche bereits eine stärkere Zersetzung des Wirkstoffs beobachten als nach einem Jahr bei Raumtemperatur. Eine 8-wöchige Lagerung bei 80°C, die zu einer guten Stabilisierung der Systeme gegenüber Kristallisationsvorgängen geführt hatte, ist wegen der starken Zersetzung, besonders zu 6β-Hydroxynorethisteronacetat, nicht praktisch anwendbar.

Bei der mehrtägigen Lagerung der wirkstoffhaltigen Matrix nach Entfernung der Abdeckfolie auf einem Objektträger bildeten sich mikroskopisch sichtbare dreieckige Kristalle, die in den als Laminat gelagerten Systemen nicht auftraten. Da dieser Kristalltyp mit keinem der Wirkstoffe in Übereinstimmung gebracht werden konnte, wurde vermutet, dass es sich um ein auskristallisiertes Zersetzungsprodukt handeln könnte. Das einzige Zersetzungsprodukt, das sich nach 4 Tagen Lagerung auf dem Objektträger als erhöht erwiesen hat, war Norethisteron. Dieses entstand jedoch in so geringer Menge, dass es wahrscheinlich nicht die Ursache für die Kristallisation darstellte. Vermutlich sind diese

Kristalle auf eine Wechselwirkung der Polymermatrix mit dem Glas des Objektträgers zurückzuführen

### 13.2 Zersetzung von E2-hemihydrat

Die gleichen TTS-Lamine wurden auch bei 220 nm auf E2-Zersetzungsprodukte untersucht. Für Estradiol konnte innerhalb von 10 Monaten bei Raumtemperatur ein Anstieg des Zersetzungsproduktes  $\Delta 9(11)$ -Estradiol um 0,1 % nachgewiesen werden (Tab. 13.2 und Abb. 13.3). Andere Zerfallsprodukte wurden nicht detektiert. Die Zersetzung lag damit noch unter der des NEA. Ein Einfluss auf die mikrokolorimetrische Messung bei 25°C war ebenfalls nicht zu erwarten.

Die einwöchige Lagerung bei 80°C zeigte für das Hauptzersetzungsprodukt  $\Delta 9(11)$ -Estradiol einen Anstieg um 0,14 % und für die 4-tägige Lagerung auf dem Objektträger konnte ebenfalls nur ein geringer Anstieg nachgewiesen werden.

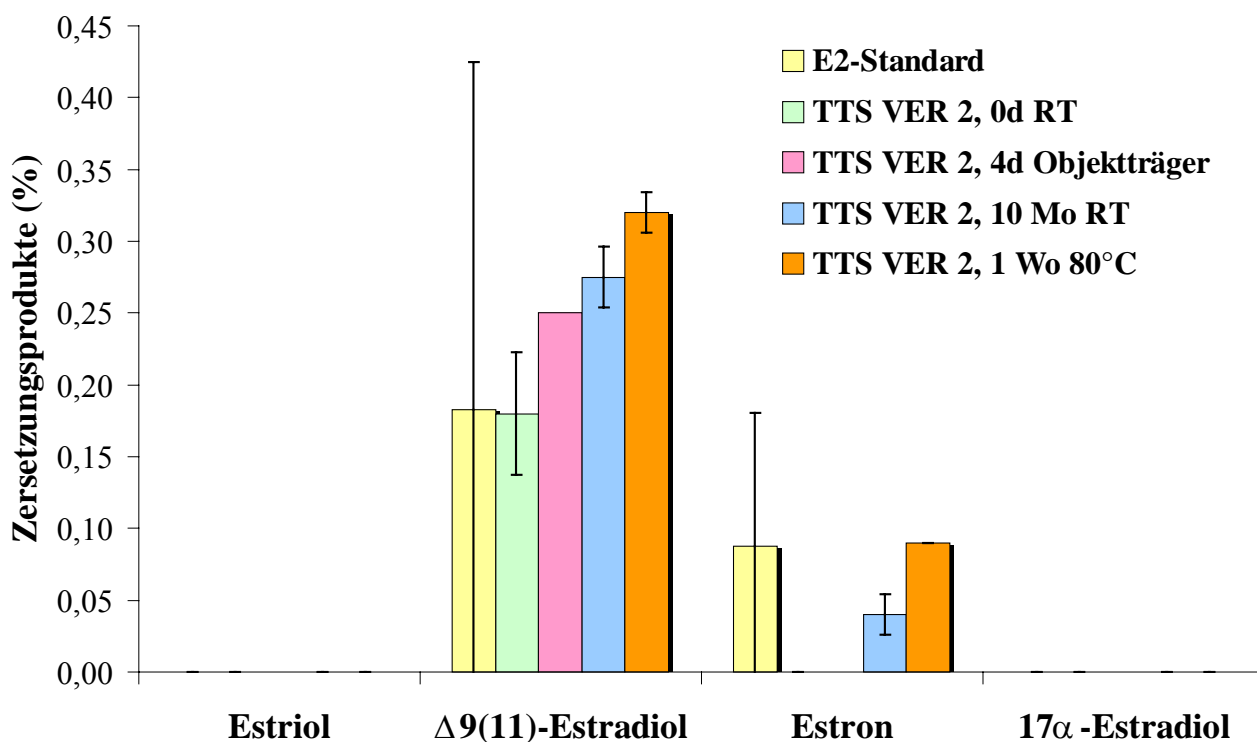


Abb. 13.3. Estradiol-Zersetzungsprodukte bei 220 nm nach Lagerung bei Raumtemperatur und bei 80°C.



Lagerbedingungen	Estradiol- Stammlösung	0 Tage RT	4 Tage Objekttr.	10 Monate RT	1 Woche 80°C
Estriol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$\Delta$ 9(11)-Estradiol	0,18	0,18	0,25	0,28	0,32
Estron	0,09	n.d.	n.d.	0,04	0,09
17 $\alpha$ -Estradiol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tab. 13.2. Estradiol-Zersetzungsprodukte (%) bei 220 nm für ein TTS VER 2.

Die Menge der Zersetzungsprodukte von Estradiol bzw. NEA, die innerhalb eines Jahres entstand, war sehr gering. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die mikrokolorimetrische Messung bei 25°C durch Zersetzungsreaktionen beeinflusst wurde. Der Arzneistoff-immanente Wärmefluss stammte demzufolge nicht von Zersetzungsreaktionen, sondern ausschließlich aus Kristallisationsprozessen.



## 14 Schlussfolgerungen

### 14.1 Kristallisation der Wirkstoffe

Bei der Herstellung von TTS stellen Kristallisationsvorgänge ein häufiges Stabilitätsproblem dar. Die Kristallisation von inkorporierten Arzneistoffen kann häufig schon mit bloßem Auge oder aber mithilfe der Polarisationsmikroskopie bzw. der Pulverröntgenbeugung verfolgt werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigten TTS, die entweder E2-hemihydrat oder NEA enthielten, charakteristische Kristallformen, deren Röntgenbeugungsmuster dem der Ausgangsstoffe entsprach. Die Wirkstoffe bildeten in der polymeren Matrix das gleiche Kristallgitter wie aus Ethylacetat. Estradiol kristallisierte in den TTS-Laminaten in seiner stabilsten Kristallform, als E2-hemihydrat.

Anders verhielt sich die Kombination der Hormone E2-hemihydrat und NEA. Die gemeinsame Kristallisation aus Ethylacetat führte zu neuen Reflexen. Aus der Wirkstoffmischung kristallisierten die Wirkstoffe nicht getrennt aus, sondern sie bildeten mindestens eine neue Kristallphase, die bevorzugt bei einem E2-Anteil von 20 bis 40 % in der Wirkstoffmischung auftrat. Ein Vergleich des Reflexmusters der Wirkstoffmischung aus Ethylacetat mit dem Röntgendiagramm der kristallisierten TTS zeigte, dass in der polymeren Matrix veränderte Reflexe bei  $8,9^\circ$  und  $11,8^\circ 2\theta$  auftraten. Die Kristallformen in der polymeren Matrix der Kombisysteme waren demnach im Vergleich zum Lösungsmittel durch das Polymer verändert. Auch mithilfe des Polarisationsmikroskops konnte neben den Kristallformen der Einzelwirkstoffe eine neue Kristallmorphologie beobachtet werden. Die Lamine waren von federförmigen Kristallen bedeckt, zwischen denen je nach Verhältnis der Hormone zueinander die prismatischen Kristalle des E2-hemihydrat oder das dendritische Wachstum des NEA in den TTS auftrat. Diese unterschiedlichen Kristallformen entsprechen verschiedenen Kristalltypen.

Beim Auftreten verschiedener Kristalle ist neben der veränderten Morphologie und dem unterschiedlichen Beugungsmuster auch mit einem veränderten Kristallisationsverhalten zu rechnen, was sich durch eine Änderung in der Kristallisationsenthalpie (Thermodynamik)

oder auch in der Geschwindigkeitskonstante (Kristallisationskinetik) äußern kann. Für die Kombinationssysteme war die Kristallisationsenthalpie, d.h. die Triebkraft der Kristallisation, niedriger als für die Einzelwirkstoffe. Trotzdem verliefen die Kristallisationsvorgänge von NEA in Gegenwart von E2-hemihydrat stark beschleunigt. Bei den gemischten Kristallen handelte es sich zwar um eine thermodynamisch weniger stabile, aber kinetisch bevorzugte Kristallform.

Da die Phasenbildung zwischen den beiden Steroidhormonen nicht aufgeklärt werden konnte, war es auch nicht möglich, den Wärmefluss bzw. die diffraktometrischen Ergebnisse der Systeme unterschiedlicher Wirkstoffverhältnisse miteinander zu vergleichen. Für einen Vergleich zwischen verschiedenen Messmethoden müsste jede Kristallphase getrennt betrachtet werden, was in der Mikrokalorimetrie nicht möglich ist, da es sich um eine unspezifische Methode handelt, bei der die Summe aller ablaufenden Prozesse erfasst wird. Eine Differenzierungsmöglichkeit war lediglich bei der Pulverröntgenbeugung gegeben, wobei auch hier ohne Strukturangaben der Kristallphasen keine exakte Mengenangabe über die Anteile der gebildeten Kristallformen vorgenommen werden konnte.

Zum besseren Vergleich zwischen den Methoden war es deshalb sinnvoll, Systeme mit gleichem Wirkstoffverhältnis, d.h. gleichem Anteil der Kristallformen am Kristallisat, zu verwenden. Dies ist mit der fixen Wirkstoffkombination aus E2-hemihydrat und NEA im Verhältnis 1:3 gelungen.

## **14.2 Kristallisationsvorgänge durch Ausstanzen**

Die Kristallisation stellt einen exothermen Prozess dar, der mikrokalorimetrisch verfolgt werden kann. Um die Lamine in die Edelstahllampullen überführen zu können, ergab sich durch das Ausstanzen ein starker initialer Wärmefluss. Die Kristallisation wurde durch den Energieeintrag mittels Stanzeisens von den Schnittkanten her initiiert. An den Rändern bildeten sich Kristallkeime, die während der folgenden Messzeit ins Innere zu wachsen begannen. Dieses Phänomen konnte auch polarisationsmikroskopisch beobachtet werden. Der Kristallisationsgrad an den Schnittflächen war wesentlich höher als im Inneren der Lamine. Der Prozess des Ausstanzens führt also zu einem hohen Energieeintrag in das

System und damit zur Überwindung der Aktivierungsenergie für die Kristallisation. Die Kristallisationshemmung, die mikroskopisch für einige Tage beobachtet werden konnte, bestand deshalb bei der mikrokolorimetrischen Messung nicht. Auch die Bestimmung der Kristallisationskinetik war dadurch gestört. Die langsame Initialphase der Kristallkeimbildung verschwand durch den Prozess des Ausstanzens. Es konnte ausschließlich die Wachstumsphase beobachtet werden.

Aufgerollte Lamine, die einen wesentlich geringeren Anteil an Schnittkanten besitzen, führten zu einer S-förmigen Wärmekurve, was einem sigmoiden Anstieg des Kristallisationsgrades entspricht. Der starke initiale Wärmefluss war demnach ausschließlich auf Ausstanzeffekte zurückzuführen.

Ein Vorteil des Ausstanzens war jedoch die gute Reproduzierbarkeit der mikrokolorimetrischen Messung der Kristallisationsvorgänge verschiedener Chargen. Bei den unter Atmosphärenbedingungen gelagerten Laminen zeigte sich häufig von Charge zu Charge ein variables Kristallisationsverhalten. Einige Chargen waren in ihrer Kristallisation stark gehemmt und zeigten eine längere Induktionszeit als andere Chargen der gleichen Zusammensetzung. Deshalb waren die Daten aus Mikroskopie und Pulverröntgenbeugung häufig nicht so gut reproduzierbar wie die der Mikrokolorimetrie, was durch die Verwendung einer sehr geringen Messfläche noch verstärkt wurde. Bei der Mikrokolorimetrie war die Messfläche im Vergleich zu den anderen Methoden wesentlich erhöht. Durch das Anstoßen der Kristallisation verlief die mikrokolorimetrisch erfasste Kristallisation gleichmäßiger und reproduzierbarer als in den Laminen, die zur Pulverröntgenbeugung bzw. Mikroskopie verwendet wurden.

Die unterschiedliche Probenbehandlung für Mikrokolorimetrie und Pulverröntgenbeugung führte des Weiteren dazu, dass die beiden Messmethoden nicht direkt miteinander verglichen werden konnten. Die gestanzten Lamine zeigten nämlich ein verändertes Kristallisationsverhalten im Vergleich zu den als Laminat gelagerten Proben, bei denen der Kristallisationsvorgang eine wesentlich längere Zeitspanne in Anspruch nahm. Das TTS VER 31 war bei mikrokolorimetrischer Messung bereits nach 5 Tagen auskristallisiert, während das Kristallisationsende der Proben für die Pulverröntgenbeugung erst nach 3 Wochen erreicht wurde. Um die Methoden besser miteinander vergleichen zu können, ist demnach eine einheitliche Probenvorbereitung ohne Ausstanzen sinnvoll.

### 14.3 Kristallisationskinetik

Die Arzneistoff-immanente Wärmemenge über 7 Tage stieg mit erhöhtem Arzneistoffgehalt meist überproportional an, da die Kristallisation bei erhöhter Übersättigung beschleunigt ablief, was auf die erhöhte thermodynamische Aktivität zurückzuführen war. Je höher die Übersättigung war, desto größer war auch die Anzahl der gebildeten Kristallkeime. Ebenso erhöht sich in Abhängigkeit von der Übersättigung auch die Wachstumsrate der Kristallflächen, wobei der Grad des Anstiegs von der Art der Wachstumskontrolle abhängt. Bei diffusionskontrolliertem Wachstum zeigt sich eine schwächere Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Übersättigung als bei einer Kontrolle durch Oberflächenintegration der gelösten Moleküle in den Kristallkeim.

Wurde innerhalb von 7 Tagen nur ein Ausschnitt des Kristallisationsvorganges erfasst, so erhöhte sich die gemessene Wärmemenge bei steigender Kristallisationsgeschwindigkeit überproportional zum Arzneistoffgehalt, da ein höherer Anteil des Kristallisationsprozesses erfasst wurde. Theoretisch sollte zwischen Kristallisationswärme und Konzentration oberhalb der Sättigungskonzentration eine lineare Beziehung bestehen. Dieser proportionale Zusammenhang konnte für vollständig kristallisierte Proben sowohl nach 7 Tagen als auch nach 5 Wochen erhalten werden, woraus die Kristallisationsenthalpie berechnet wurde.

### 14.4 Vergleich der Methoden

Die Methoden der Polarisationsmikroskopie, Mikrokolorimetrie und Pulverröntgenbeugung waren geeignet, um Kristallisationsvorgänge in transdermalen Systemen zu untersuchen. Sie unterschieden sich allerdings stark im Zeitaufwand sowie in ihrer Empfindlichkeit, was in Tab. 14.1 beim Vergleich der Sättigungslöslichkeiten sichtbar wird. Polarisationsmikroskopie, HPLC und Pulverröntgenbeugung waren wesentlich zeitintensiver als die Mikrokolorimetrie, die allerdings wenig spezifisch ist.

Sättigungslöslichkeit	E2-hemihydrat	NEA	E2/NEA 1:3
Polarisationsmikroskopie	1,5 %	4 %	4 %
HPLC	1,65 %	3,85 %	-
XRPD	2-3 %	4,5-6 %	4-5 %
TAM: Arzneistoff- immanenter Wärmefluss	2 %	2 %	2 %

Tab. 14.1. Vergleich der Detektionsgrenzen der angewendeten Methoden.

#### 14.4.1 Mikrokolorimetrie

Mithilfe der Mikrokolorimetrie konnten geringe Wärmeflüsse von 0,1  $\mu\text{W/g}$  Matrix registriert werden, ohne dass die betreffenden NEA-haltigen Systeme innerhalb eines Jahres ein Kristallwachstum zeigten (TTS VER 15 und 25). Für das 4 %ige NEA-haltige TTS lieferte die Mikrokolorimetrie bereits einen Arzneistoff-immanenten Wärmefluss von 0,3 bis 0,2  $\mu\text{W/g}$ , der sich signifikant vom Placebo-System unterschied. Mikroskopisch konnten in diesen Laminaten Kristalle erst nach 5 Wochen und auch nur sehr vereinzelt beobachtet werden, was einen erheblichen Zeitgewinn für Stabilitätsuntersuchungen durch die Mikrokolorimetrie bedeuten würde. Andererseits wurden bei 1,5 % E2-hemihydrat bereits nach 2 Wochen Kristalle im Mikroskop beobachtet, wobei kein Wärmefluss detektierbar war. Die Empfindlichkeit der Mikrokolorimetrie für Kristallisationsvorgänge unterschied sich anscheinend für E2-hemihydrat und NEA. Für NEA-haltige Systeme ergab sich eine höhere Empfindlichkeit der Methode als für E2-haltige TTS (Tab. 14.1).

Die Empfindlichkeit der Mikrokolorimetrie hängt von verschiedenen Faktoren ab, der Reaktionsenthalpie, der Reaktionsgeschwindigkeit und der Probenmenge. Die Kristallisationsenthalpie für E2-hemihydrat und NEA war annähernd gleich. Festgestellt wurde allerdings, dass die E2-Kristallisation langsamer ablief als die Kristallisation von NEA. Wenn man von einer ähnlichen Kristallisationswärme ausgeht, so ergibt sich für E2-hemihydrat ein geringerer Wärmefluss über einen längeren Zeitraum. Dies könnte eine mögliche Ursache für eine höhere Detektionsgrenze bei E2 darstellen.

Auch andere Prozesse außer der Kristallisation werden mikrokalorimetrisch erfasst. Die beiden Wirkstoffe unterscheiden sich geringfügig in der Zersetzung. Das stärkste Zersetzungsprodukt des NEA zeigt eine doppelt so hohe Zersetzung wie das des E2-hemihydrat, sodass die Möglichkeit besteht, dass für NEA zu einem geringen Teil auch die Zersetzung des Wirkstoffs registriert wird und einen geringen exothermen Wärmefluss hervorruft.

Wenn sich kein oder nur ein sehr geringer Wärmefluss zeigt, so waren stets weitergehende, spezifische Untersuchungen über die Stabilität bzw. die Art der Instabilität nötig. Die Mikrokalorimetrie liefert lediglich einen Anhaltspunkt. Bei komplexen galenischen Formulierungen besitzt sie den Vorteil, alle Vorgänge unspezifisch zu erfassen. Häufig liefern auch Hilfsstoffe einen entscheidenden Beitrag zum registrierten Wärmefluss. Die Erfassungsgrenze von Arzneistoffinstabilitäten ist dann vom Arzneistoffgehalt, d.h. vom Anteil des Arzneistoff-immanenten Wärmefflusses am Gesamtwärmeffluss abhängig. Nach Differenzierung zwischen Placebo-Wärmeffluss und wirkstoffassoziiertem Wärmeffluss lassen sich starke Instabilitäten zeitsparend erkennen, ohne dass Details über die möglichen Prozesse, d.h. Zersetzung, Kristallisation oder Hygroskopizität, verschiedenster Bestandteile bekannt sind.

Eine allgemeine Aussage über die Stabilität lässt sich aus der Mikrokalorimetrie allerdings nicht ableiten. Viel mehr sind vergleichende Messungen zwischen verschiedenen Formulierungen bzw. die Erkennung von Einflüssen durch Veränderungen in der Rezeptur oder den Herstellbedingungen möglich. Anwendung könnte die Mikrokalorimetrie beispielsweise bei der Beurteilung finden, ob Hilfsstoffe zu einer Stabilisierung gegenüber Kristallisationsvorgängen oder einer verstärkten Kristallisation führen, d.h. Kristallisationsinhibitoren oder Kristallisationsinitiatoren sind.

#### **14.4.2 Pulverröntgenbeugung**

Die Pulverröntgenbeugung gehört im Gegensatz zur Mikrokalorimetrie zu den spezifischen Methoden, mit denen Kristallisationsvorgänge selektiv aufgeklärt werden können. Das Röntgendiffraktometer besitzt allerdings eine geringere Empfindlichkeit bei der Detektion von Kristallisationsvorgängen als die Mikrokalorimetrie und sein Betrieb ist wesentlich



zeitaufwendiger, bis Aussagen über das Kristallisationsverhalten getroffen werden können. Selbst mit bloßem Auge sichtbare organische Kristalle in der polymeren Matrix konnten zum Teil nicht mit der Röntgenbeugung erfasst werden. Die Detektionsgrenze liegt im Vergleich zur Polarisationsmikroskopie bei etwa 1,5 % Kristallinität in der amorphen Matrix (Tab. 14.1).

Dem Verlust an Empfindlichkeit steht der Gewinn an Spezifität gegenüber. Es lassen sich sehr detaillierte Aussagen über Mengenverhältnisse verschiedener Kristallformen in der Mischung machen. Die Schwankung der Messwerte innerhalb eines Systems sowie zwischen verschiedenen Chargen ist allerdings sehr hoch, d.h. die Reproduzierbarkeit ist vergleichsweise gering. Auch der hohe Zeitaufwand steht einer breiteren Anwendung bei der Bestimmung von Stabilitäten gegenüber.

### **14.4.3 Polarisationsmikroskopie**

Die Polarisationsmikroskopie hat sich als zuverlässigste und empfindlichste Methode erwiesen. Sie bietet allerdings keine Möglichkeit einer Quantifizierung und ist sehr zeitaufwendig bis zum Erreichen eines Ergebnisses über Kristallisationsvorgänge.



## 15 Zusammenfassung

Transdermale Therapeutische Systeme (TTS) sind Arzneiformen, die über einen längeren Zeitraum eine kontrollierte Arzneistoffabgabe durch die Haut ermöglichen. Um ausreichende Permeationsraten zu erreichen, sind häufig hohe Arzneistoffkonzentrationen im Reservoir notwendig. In TTS, deren Arzneistoffkonzentration über der Sättigungskonzentration der Matrix liegt, neigen die Wirkstoffe dazu auszukristallisieren. Die Kristallisation stellt ein wichtiges Stabilitätsproblem bei der Entwicklung solcher Systeme dar, da die Bioverfügbarkeit negativ beeinflusst werden kann.

Diese Studie zeigt, dass Kristallisationsprozesse in TTS mithilfe der isothermen Wärmeleitungsmikrokalorimetrie über eine Messzeit von 7 Tagen mit hoher Empfindlichkeit erfasst werden können, denn die Kristallisation stellt einen exothermen Prozess dar. Die mikrokalorimetrische Messkurve zeigte sowohl bei Placebo- als auch bei wirkstoffhaltigen Zubereitungen einen starken initialen, exothermen Wärmefluss, der über einige Tage langsam abfiel bis ein konstantes Wärmeflussplateau erreicht wurde. Der hohe initiale Wärmefluss entstand durch das Ausstanzen der Lamine und die damit verbundene mechanische Beanspruchung. Die Kristallisation wurde von den Stanzzrändern ausgehend initiiert und war damit an den Schnittkanten auch stärker ausgeprägt als im Inneren der Lamine. An den Schnittstellen des TTS waren mikroskopisch wesentlich mehr Kristalle nachweisbar als in den nicht mechanisch beanspruchten Bereichen.

Die messbare Arzneistoff-immanente Wärmemenge stieg mit erhöhtem Arzneistoffgehalt an, war aber über 7 Tage bei den E2-haltigen und NEA-haltigen TTS-Laminen nicht proportional zum Arzneistoffgehalt, da die Kristallisation nach dieser Messzeit nicht beendet war. Dieses Ergebnis konnte durch die mit steigender Übersättigung beschleunigte Kristallisation erklärt werden, die für alle untersuchten Messreihen beobachtet wurde. Je höher die Arzneistoffkonzentration in den Laminen war, desto stärker war auch die Triebkraft für Kristallisationsvorgänge. Das Kristallisationsende war rascher erreicht. War die Kristallisationsgeschwindigkeit dagegen über einen gewissen Konzentrationsbereich konstant oder war der Kristallisationsprozess während der Messzeit bereits beendet, so stieg die Arzneistoff-immanente Wärmemenge proportional zur erhöhten Arzneistoff-

konzentration. Eine konstante Kristallisationsgeschwindigkeit wurde für NEA im Bereich von 4 bis 10 % beobachtet. Bei höherer Übersättigung verlief der Kristallisationsprozess allerdings ebenfalls beschleunigt.

Die Kristallisationsgeschwindigkeitskonstante sowie der Avrami-Exponent als Parameter für den Kristallisationsmechanismus konnten anhand der mikrokalorimetrischen Daten berechnet werden, ebenso wie die Kristallisationsenthalpien in Höhe von  $-23,3 \pm 1,2$  kJ/mol für E2-hemihydrat,  $-22,8 \pm 2,6$  kJ/mol für NEA sowie  $-7,9 \pm 0,95$  kJ/mol für die 1:3-Mischung. Alle Kristallisationsvorgänge waren durch die hohe Viskosität der Matrix diffusionskontrolliert und zeigten ein eindimensionales Kristallwachstum.

Bei der Mikrokalorimetrie handelt sich um eine unspezifische Methode, bei der der Ursprung der Wärmeeffekte durch zusätzliche Methoden aufgeklärt werden muss. Als weitere Untersuchungsmethoden bei der Kristallisation in transdermalen Systemen boten sich die Polarisationsmikroskopie und die Pulverröntgenbeugung an. Die DSC war ungeeignet. Im Vergleich zur Mikrokalorimetrie war die polarisationsmikroskopische Untersuchung von Kristallisationsprozessen jedoch wesentlich zeitaufwendiger, wobei sich die Empfindlichkeit als höher erwiesen hat. Die Mikrokalorimetrie detektierte im Vergleich zur Mikroskopie erst eine Kristallmenge von ungefähr 0,5 % zuverlässig.

Die Pulverröntgenbeugung stellte im Vergleich zu Mikroskopie und Mikrokalorimetrie eine weniger empfindliche analytische Methode für die Erkennung von kristallinem organischen Material in einer polymeren amorphen Matrix dar. Während kleine Kristalle in den Polymerfilmen bereits mit bloßem Auge zu sehen waren, traten zum Teil keine Reflexe im Pulverdiagramm auf. Die Detektionsgrenze lag im Vergleich zur Mikroskopie bei ungefähr 1 bis 1,5 % Kristallen in der polymeren Umgebung. Dagegen ist die Pulverröntgenbeugung für verschiedene Kristalltypen sehr spezifisch. Sie erlaubt die Aufklärung von Strukturen sowie eine quantitative Auswertung der Kristallmengen in Mischungen, sofern die Kristalltypen bekannt sind.

Mithilfe der Polarisationsmikroskopie und Pulverröntgenbeugung wurden die Kristallstrukturen der Arzneistoffe in der polymeren Matrix der TTS untersucht. Für Systeme, die nur einen der Arzneistoffe enthielten, wurde eine unveränderte Kristallisation in der Matrix in Form von E2-hemihydrat bzw. NEA beobachtet. Die Kombination von E2-

hemihydrat und NEA veränderte die Kristallstruktur der gebildeten Kristalle im Vergleich zu den reinen Arzneistoffen und führte zur Ausbildung einer neuen Kristallstruktur in der Matrix, die sich in den Reflexlagen auch von der aus Ethylacetat kristallisierten unterschied. Sogar geringe E2-Konzentrationen führten zu einer deutlichen Veränderung der Kristallform und des Röntgenbeugungsmusters der NEA-Kristalle. Außerdem wurde der Kristallisationsprozess durch die Kombination der Hormone stark beschleunigt. Bei der neuen Kristallform handelte es sich um eine thermodynamisch weniger stabile Struktur, da die Kristallisationsenthalpie geringer war, allerdings war die Kristallisation kinetisch bevorzugt.

Trotz der Unterschiede in der Empfindlichkeit der Methoden, die zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit angewendet wurden, stehen die erhaltenen Ergebnisse entsprechend den Detektionsgrenzen in guter Übereinstimmung, wobei es sich bei den ermittelten Werten von 1,5 % für E2-hemihydrat und 4 % für NEA unter Umgebungsbedingungen um die Sättigungslöslichkeit unter Kristallisationsbedingungen und nicht um die wahre Sättigungslöslichkeit handelt.

Hohe Feuchtigkeit in der polymeren Matrix fördert die E2-hemihydrat- sowie NEA-Kristallisation durch die geringe Wasserlöslichkeit der Steroidhormone. Die Trocknungsbedingungen konnten die physikalische Stabilität der Pflaster stark beeinflussen, was eventuell auch durch die Ausbildung einer besser löslichen, wasserfreien Kristallform des Estradiols begründet sein könnte. Die Vorbehandlung der Lamine bei 80°C scheint eine gute Möglichkeit zu sein, die TTS vor Kristallisationsprozessen zu schützen, wobei bei der Lagerdauer ein Kompromiss zwischen der physikalischen Stabilisierung und der chemischen Zersetzung gefunden werden muss.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass es sich bei der Mikrokolorimetrie um eine zeitsparende und effektive Methode für die Beurteilung einer Vorbehandlung bei 80°C sowie des Einflusses von verschiedenen Hilfsstoffen auf den Kristallisationsprozess der Arzneistoffe im TTS handelt. Die Mikrokolorimetrie ermöglichte dabei innerhalb von 7 Tagen die Klassifikation verschiedener Zusatzstoffe nach deren Effizienz, die Kristallisation in den Pflastern zu initiieren. Dagegen sind häufig viele Monate nötig, um ähnlich zuverlässige Ergebnisse mit der Polarisationsmikroskopie bzw. der

Pulverröntgenbeugung zu erhalten. Die Mikrokalorimetrie stellt demnach eine interessante Methode für ein Hilfsstoffscreening und die Optimierung von Rezepturen dar.



## TEIL C

### **Literaturverzeichnis**



## 16 Verwendete und zitierte Literatur

- Ahmed H., Buckton G., Rawlins D.A., The use of isothermal microcalorimetry in the study of small degrees of amorphous content of a hydrophobic powder, *Int. J. Pharm.* 130 (1996), 195-201
- Ahmed H., Buckton G., Rawlins D.A., Crystallisation of partially amorphous griseofulvin in water vapour: determination of kinetic parameters using isothermal heat conduction microcalorimetry, *Int. J. Pharm.* 167 (1998), 139-145
- Allmann R., Röntgenpulverdiffraktometrie, Springer-Verlag, Clausthaler tektonische Hefte 29 (1994)
- Angberg M., Lactose and thermal analysis with special emphasis on microcalorimetry, *Thermochim. Acta* 248 (1995), 161-176
- Angberg M., Nyström C., Castensson S., Evaluation of heat-conduction microcalorimetry in pharmaceutical stability studies, II. Methods to evaluate the microcalorimetric respons, *Int. J. Pharm.* 61 (1990), 67-77
- Angberg M., Nyström C., Castensson S., Evaluation of heat-conduction microcalorimetry in pharmaceutical stability studies, VII. Oxidation of ascorbic acid in aqueous solution, *Int. J. Pharm.* 90 (1993), 19-33
- Angberg M., Nyström C., Evaluation of heat-conduction microcalorimetry in pharmaceutical stability studies, I. Precision and accuracy for static experiments in glass vials, *Acta Pharm. Suec.* 25 (1988), 307-320
- Asmussen B., Transdermal therapeutic systems - actual state and future developments, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 13 (1991), 343-351
- Aso Y., Yoshioka S., Otsuka T., Kojima S., The physical stability of amorphous nifedipin determined by isothermal microcalorimetry, *Chem. Pharm. Bull.* 43 (1995), 300-303
- Atkins P.W., *Physikalische Chemie*, VCH (1990), 2. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage 1987, 41-132, 561-584

- Audet M.-C., Moreau M., Koltun W.D., Waldbaum A.S., Shangold G., Fisher A.C., Creasy G.W., Evaluation of contraceptive efficacy and cycle control of a transdermal contraceptive patch vs an oral contraceptive, *J. Am. Med. Assoc.* 285(18) (2001), 2347-2354
- Avrami M., Kinetics of phase change. I General theory, *J. Chem. Phys.* 7 (1939), 1103-1112
- Avrami M., Kinetics of phase change. II Transformation-time relations for random distribution of nuclei, *J. Chem. Phys.* 8 (1940), 212-224
- Bauer K.H., Frömmering K.-H., Führer C., *Pharmazeutische Technologie*, Gustav Fischer (1997) 4. Aufl., 193-194
- Beezer A.E., Gaisford S., Hills A.K., Willson R.J., Mitchell J.C., Pharmaceutical microcalorimetry: applications to long-term stability studies, *Int. J. Pharm.* 179 (1999), 159-165
- Bloch D.W., Speiser P.P., *Solid Dispersions - Fundamentals and Examples*, *Pharm. Acta Helv.* 62(1) (1987), 23-27
- Brandstätter-Kuhnert M., Kofler A., Zur mikroskopischen Identitätsprüfung und zur Polymorphie der Sexualhormone, *Mikrochim. Acta* (6) (1959), 847-853
- Brettschneider H., Diabetes - Wird Insulin bald auf die Haut geklebt und in die Nase gesprüht ?, *Ärzte Zeitung*, 8.06.2000
- Briggner L.E., Buckton G., Bystrom K., Darcy P., The use of isothermal microcalorimetry in the study of changes in crystallinity induced during the processing of powders, *Int. J. Pharm.* 105 (1994), 125-135
- Brittain H.G., X-ray diffraction I - On the diffraction of X-rays by crystalline solids, *Pharm. Tech.* (2000), 74-82
- Buckton G., Beezer A.E., Invited Review - The applications of microcalorimetry in the field of physical pharmacy, *Int. J. Pharm.* 72 (1991), 181-191
- Buckton G., Darcy P., Assessment of disorder in crystalline powders - a review of analytical techniques and their application, *Int. J. Pharm.* 179 (1999), 141-158

- Buckton G., Darcy P., Greenleaf D., Holbrook P., The use of isothermal microcalorimetry in the study of changes in crystallinity of spray-dried salbutamol sulphate, *Int. J. Pharm.* 116 (1995a), 113-118
- Buckton G., Darcy P., The influence of additives on the recrystallisation of amorphous spray dried lactose, *Int. J. Pharm.* 121 (1995b), 81-87
- Burger A., Ramburger R., Schmidt W., Nachhärtung und Zerfallscharakteristik bei Tabletten aus metastabilen polymorphen Modifikationen, *Pharmazie* 35(11) (1980), 711
- Busetta P.B., Hospital M., Structure Cristalline et Moléculaire de l'Oestradiol Hemihydrate, *Acta Cryst. B* 28 (1972), 560-567
- Byrn S., Pfeiffer R., Ganey M., Hoiberg C., Poochikian G., Pharmaceutical solids: A strategic approach to regulatory considerations, *Pharm. Res.* 12(7) (1995), 945-954
- Castro M., Domínguez-Adame F., Sánchez A., Rodríguez T., Model for crystallization kinetics: Deviations from Kolmogorov-Johnson-Mehl-Avrami kinetics, *Appl. Phys. Lett.* 75(15) (1999), 2205-2207
- Chang S.-L., Hofmann G.A., Zhang L., Deftos L.J., Banga A.K., The effect of electroporation on iontophoretic transdermal delivery of calcium regulating hormones, *J. Contr. Rel.* 66 (2000), 127-133
- Chidavaenzi O.C., Buckton G., Koosha F., Pathak R., The use of thermal techniques to assess the impact of feed concentration on the amorphous content and polymorphic forms present in spray dried lactose, *Int. J. Pharm.* 159 (1997), 67-74
- Chidavaenzi O.C., Buckton G., Koosha F., The effect of co-spray drying with polyethylene glycol 4000 on the crystallinity and physical form of lactose, *Int. J. Pharm.* 216 (2001), 43-49
- Corrigan D.O., Healy A.M., Corrigan O.I., The effect of spray drying solutions of polyethylene glycol (PEG) and lactose/PEG on their physicochemical properties, *Int. J. Pharm.* 235 (2002), 193-205
- Daniels R., Arzneiformen zur Gabe von Hypothalamus- und Sexualhormonen, *PZ* 142(48) (1997), 4293-4299

- Darcy P., Buckton G., Quantitative assessments of powder crystallinity: Estimates of heat and mass transfer to interpret isothermal microcalorimetry data, *Thermochim. Acta* 316 (1998), 29-36
- Darcy P.A., Wiencek J.M., Estimating lysozyme crystallization growth rates and solubility from isothermal microcalorimetry, *Acta Cryst. D54* (1998), 1387-1394
- Davis A.F., Hadgraft J., Effect of supersaturation on membrane transport: 1. Hydrocortisone acetate, *Int. J. Pharm.* 76 (1991), 1-8
- Dittgen M., Transdermale Therapeutische Systeme (TTS), in Müller R.H., Hildebrand G.E., *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*, WVG Stuttgart (1997), 133-156
- Dittgen M., Transdermale therapeutische Systeme (TTS), *MMP* 21(12) (1998), 366-376
- Duddu S.P., Weller K., Importance of glass transition temperature in accelerated stability testing of amorphous solids: Case study using a lyophilized aspirin formulation, *J. Pharm. Sci.* 85(3) (1996), 345-347
- Edwards D.A., Prausnitz M.R., Langer R., Weaver J.C., Analysis of enhanced transdermal transport by skin electroporation, *J. Contr. Rel.* 34 (1995), 211-221
- Elamin A.A., Sebhatu T., Ahlneck C., The use of amorphous model substances to study mechanically activated materials in the solid state, *Int. J. Pharm.* 119 (1995), 25-36
- Fang J.-Y., Sung K.C., Lin H.-H., Fang C.-L., Transdermal iontophoretic delivery of diclofenac sodium from various polymer formulations: in vitro and in vivo studies, *Int. J. Pharm.* 178 (1999), 83-92
- Finnin B.C., Morgan T.M., Transdermal penetration enhancers: Applications, limitations, and potential, *J. Pharm. Sci.* 88(10) (1999), 955-958
- Ford J.L., The current status of solid dispersions, *Pharm. Acta Helv.* 61(3) (1986), 69-88
- Frigerio A., Bodega F., *Neue Arzneiformen*, *Spektrum der Wissenschaften, Spezial 6: Pharmaforschung* (1997), 72-79
- Fukuoka E., Makita M., Yamamura S., Glassy state of pharmaceuticals. III. Thermal properties and stability of glassy pharmaceuticals and their binary glass systems, *Chem. Pharm. Bull.* 37(4) (1989), 1047-1050
- Gorukanti S.R., Lianli L.I., Kwon H.K., Transdermal delivery of antiparkinsonian agent, benztropine. I. Effect of vehicles on skin permeation, *Int. J. Pharm.* 192 (1999), 159-172

- Graydon J.W., Thorpe S.J., Kirk D.W., Determination of the Avrami exponent for solid state transformations from non-isothermal differential scanning calorimetry, *J. Non-Cryst. Solids* 175 (1994), 31-43
- Gustafsson Ch., Lennholm H., Iversen T., Nyström C., Comparison of solid-state NMR and isothermal microcalorimetry in the assessment of the amorphous component of lactose, *Int. J. Pharm.* 174 (1998), 243-252
- Hadgraft J., Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery, *Int. J. Pharm.* 184 (1999), 1-6
- Hadgraft J., Peck J., Williams D.G., Pugh W.J., Allan G., Mechanisms of action of skin penetration enhancers/retarders: Azone and analogues, *Int. J. Pharm.* 141 (1996), 17-25
- Hamaura T., Newton J.M., Interaction between water and poly(vinylpyrrolidone) containing polyethylene glycol, *J. Pharm. Sci.* 88(11) (1999), 1228-1233
- Hansen L.D., Lewis E.A., Eatough D.J., Bergstrom R.G., DeGraft-Johnson D., Kinetics of drug decomposition by heat conduction calorimetry, *Pharm. Res.* 6 (1989), 20-27
- Harmia T., Speiser P., Kreuter J., A solid colloidal drug delivery system for the eye: encapsulation of pilocarpin in nanoparticles, *J. Microencapsulation* 3 (1986), 3-12
- Heilmann K., *Therapeutische Systeme*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1984), 4. Aufl., 23-36
- Hemminger W., Höhne G., *Grundlagen der Kalorimetrie*, Verlag Chemie Weinheim (1979), 1-74, 115-189
- Hemminger W.F., Cammenga H.K., *Methoden der thermischen Analyse*, Springer-Verlag (1989), 100-200
- Higuchi T., Shih F.-M.L., Kimura T., Rytting J.H., Solubility determination of barely aqueous-soluble organic solids, *J. Pharm. Sci.* 68(10) (1979), 1267-1272
- Hino T., Ford J.F., Characterisation of the hydroxypropylmethylcellulose - nicotinamide binary system, *Int. J. Pharm.* 219 (2001), 39-49
- Högger P., Universität Münster: Transdermale therapeutische Systeme, *DAZ* 138(26) (1998), 2454
- Hülsmann S., Backensfeld T., Bodmeier R., Stability of extruded 17 $\beta$ -estradiol solid dispersion, *Pharm. Dev. Technol.* 6(2) (2001), 223-229

- Hülsmann S., Backensfeld T., Keitel S., Bodmeier R., Melt extrusion – an alternative method for enhancing the dissolution rate of 17 $\beta$ -estradiol hemihydrate, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 49 (2000), 237-242
- Hutchinson B., Jonsson S. Ryde L., On the kinetics of recrystallisation in cold worked metals, *Scr. met.* 23 (1989), 671-676
- Iervolino M., Cappello B., Raghavan S.L., Hadgraft J., Penetration enhancement of ibuprofen from supersaturated solutions through human skin, *Int. J. Pharm.* 212(1) (2001), 131-141
- Iervolino M., Raghavan S.L., Hadgraft J., Membrane penetration enhancement of ibuprofen using supersaturation, *Int. J. Pharm.* 198 (2000), 229-238
- Kabasakalian P., Britt E., Yudis M.D., Solubility of some steroids in water, *J. Pharm. Sci.* 55 (1966), 642
- Kawakami K., Numa T., Ida Y., Assessment of amorphous content by microcalorimetry, *J. Pharm. Sci.* 91(2) (2002), 417-422
- Kerc J., Srcic S., Thermal analysis of glassy pharmaceuticals, *Thermochim. Acta* 248 (1995), 81-95
- Kim J.-H., Choi H.-K., Effect of additives on the crystallization and the permeation of ketoprofen from adhesive matrix, *Int. J. Pharm.* 236 (2002), 81-85
- Koch P., Allergic contact dermatitis from estradiol and norethisterone acetat in a transdermal hormonal patch, *Contact Dermatitis* 44 (2001), 112-113
- Koenigbauer M.J., Brooks S.H., Rullo G., Couch R.A., Solid-state stability testing of drugs by isothermal calorimetry, *Pharm. Res.* 9(7) (1992), 939-944
- Koenigbauer M.J., Pharmaceutical applications of microcalorimetry, *Pharm. Res.* 11(6) (1994), 777-783
- Kotiyani P.N., Vavia P.R., Eudragits: Role as crystallization inhibitors in drug-in-adhesive transdermal systems of estradiol, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52 (2001), 173-180
- Kreuter J., Feste Dispersionen, in J. Kreuter, C.-D. Herzfeldt, *Grundlagen der Arzneiformenlehre Galenik 2*, Springer Frankfurt/Main (1999), 262-274
- Krischner H., Koppelhuber-Bitschnau B., Röntgenstrukturanalyse und Rietveldmethode, Vieweg-Verlag (1994), 5. Aufl.

- Krüger P., Woldt E., The use of an activation energy distribution for the analysis of the recrystallization kinetics of copper, *Acta Metall. Mater.* 40 (1992), 2933-2942
- Kubota N., Yokota M., Mullin J.W., Supersaturation dependence of crystal growth in solutions in the presence of impurity, *J. Cryst. Growth* 182 (1997), 86-94
- Kuhnert-Brandstätter M., Grimm H., Zur Unterscheidung von lösungsmittelhaltigen pseudopolymorphen Kristallformen und polymorphen Modifikationen bei Steroidhormonen. I, *Mikrochim. Acta* (1968a), 115-126
- Kuhnert-Brandstätter M., Grimm H., Zur Unterscheidung von lösungsmittelhaltigen pseudopolymorphen Kristallformen und polymorphen Modifikationen bei Steroidhormonen. II, *Mikrochim. Acta* (1968b), 127-139
- Kuhnert-Brandstätter M., Junger E., I.R.-Spektroskopische Untersuchungen an polymorphen Kristallmodifikationen von Alkoholen und Phenolen, *Spectrochim. Acta* 23A (1967), 1453-1461
- Kuhnert-Brandstätter M., Martinek A., Über den Einfluß der Polymorphie auf die Löslichkeit von Arzneimitteln, *Mikrochim. acta* (5-6) (1965), 909-919
- Kuhnert-Brandstätter M., Winkler H., Thermoanalytische und IR-spektroskopische Untersuchung an verschiedenen Kristallformen von Arzneistoffen aus der Östradiol- und Androstangruppe, *Sci. Pharm.* 44(3) (1976), 177-190
- Laarhoven J.A.H., Kruft M.A.B., Vromans H., Effect of supersaturation and crystallization phenomena on the release properties of a controlled release device based on EVA copolymer, *J. Contr. Rel.* 82 (2002), 309-317
- Larrucea E., Arellano A., Santoyo S., Ygartua P., Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52 (2001), 113-119
- Leeder O., Blankenburg H.-J., *Polarisationsmikroskopie*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig (1989), 1. Aufl.
- Lehto V.P., Laine E., A kinetic study on crystallization of an amorphous lubricant, *Pharm. Res.* 14(7) (1997), 899-904
- Lehto V.-P., Laine E., A kinetic study of polymorphic transition of anhydrous caffeine with microcalorimeter, *Thermochim. Acta* 317(1) (1998), 47-58

- Leuner C., Dressman J., Review article - Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000), 47-60
- Lipp R., Müller-Fahrnow A., Use of X-ray crystallography for the characterization of single crystals grown in steroid containing transdermal drug delivery systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47 (1999), 133-138
- Lipp R., Selection and use of crystallisation inhibitors for matrix-type transdermal drug-delivery systems containing sex steroids, *J. Pharm. Pharmacol.* 50 (1998), 1343-1349
- Lloyd G.R., Craig D.Q.M., Smith A., An investigation into the melting behavior of binary mixes and solid dispersions of Paracetamol and PEG 4000, *J. Pharm. Sci.* 86(9) (1997), 991-996
- Lundberg B., Temperature effect on the water solubility and water-octanol partition of some steroids, *Acta Pharm. Suec.* 16 (1979), 151-159
- Ma X., Taw J., Chiang C.-M., Control of drug crystallization in transdermal matrix system, *Int. J. Pharm.* 142 (1996), 115-119
- Maffezzoli A., Kenny J.M., Torre L., On the physical dimensions of the Avrami constant, *Thermochim. Acta* 269/270 (1995), 185-190
- Mazzobre M.R., Soto G., Aguilera J.M., Buera M.P., Crystallization kinetics of lactose in systems co-lyophilized with trehalose. Analysis by differential scanning calorimetry, *Food Res. Int.* 34 (2001), 903-911
- Megrab N.A., Williams A.C., Barry B.W., Oestradiol permeation through human skin and silastic membrane: effects of propylene glycol and supersaturation, *J. Contr. Rel.* 36 (1995), 277-294
- Mizuno A., Mitsuiki M., Motoki M., Effect of crystallinity on the glass transition temperature of starch, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998), 98-103
- Monti D., Giannelli R., Chetoni P., Burgalassi S., Comparison of the effect of ultrasound and of chemical enhancers on transdermal permeation of caffeine and morphine through hairless mouse skin in vitro, *Int. J. Pharm.* 229 (2001), 131-137
- Moser K., Kriwet K., Froehlich C., Naik A., Kalia Y.N., Guy R.H., Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52 (2001), 103-112



- Müller G., Raith M., Methoden der Dünnschliffmikroskopie, Verlag Ellen Pilger, Clausthaler tektonische Hefte 14 (1981), 3. neubearbeitete Aufl.
- Muraleedharan R.V., Variation of slope in Avrami plots, Scripta Mater. 40(12) (1999), 1367-1370
- Nair R., Nyamweya N., Gönen S., Martínez-Miranda L.J., Hoag S.W., Influence of various drugs on the glass transition temperature of poly(vinylpyrrolidone): a thermodynamic and spectroscopic investigation, Int. J. Pharm. 225 (2001), 83-96
- Needham G.F., Pfeiffer R.R., Engel G.L., Rutherford B.S., Allen D.J., Effect of impurities on estradiol crystallization in a sustained-release implant, J. Pharm. Sci. 81(10) (1992), 1012-1014
- Ng W.-L., Thermal decomposition in the solid state, Aust. J. Chem. 28 (1975), 1169-1178
- Pellett M.A., Castellano S., Hadgraft J., Davis A.F., The penetration of supersaturated solutions of piroxicam across silicone membranes and human skin in vitro, J. Contr. Rel. 46 (1997), 205-214
- Pellett M.A., Davis A.F., Hadgraft J., Effect of supersaturation on membrane transport: 2. Piroxicam, Int. J. Pharm. 111 (1994), 1-6
- Pflegel P., Dittgen M., Arzneimittel und Organismus (VI) - Transdermale therapeutische Systeme, Pharmazie 42(12) (1987), 799-807
- Pirttimäki J., Laine E., Ketolainen J., Paronen P., Effects of grinding and compression on crystal structure of anhydrous caffeine, Int. J. Pharm. 95 (1993), 93-99
- Potts R.O., Golden G.M., Francoeur M.L., Mak V.H.W., Guy R.H., Mechanism and enhancement of solute transport across the stratum corneum, J. Contr. Rel. 15 (1991), 249-260
- Pradell T., Crespo C., Clavaguera N., Clavaguera-Mora M.T., Diffusion controlled grain growth in primary crystallization: Avrami exponents revisited, J. Phys. Condens. Matter 10 (1998), 3833-3844
- Prausnitz M.R., Do high-voltage pulses cause changes in skin structure ?, J. Contr. Rel. 40 (1996), 321-326

- Pudipeddi M., Sokoloski Th.D., Duddu S.P., Carstensen J.T., Calorimetric determination of the heat of precipitation of pseudoephedrine racemic compound - Its agreement with the heat of solution, *J. Pharm. Sci.* 84(10) (1995), 1236-1239
- Raghavan S.L., Kieper B., Davis A.F., Kazarian S.G., Hadgraft J., Membrane transport of hydrocortisone acetate from supersaturated solutions; the role of polymers, *Int. J. Pharm.* 221 (2001b), 95-105
- Raghavan S.L., Trividic A., Davis A.F., Hadgraft J., Crystallization of hydrocortisone acetate: influence of polymers, *Int. J. Pharm.* 212 (2001a), 213-221
- Raghavan S.L., Trividic A., Davis A.F., Hadgraft J., Effect of cellulose polymers on supersaturation and in vitro membrane transport of hydrocortisone acetate, *Int. J. Pharm.* 193 (2000), 231-237
- Rall B., Die Haut als Applikationsort nutzen, *DAZ* 140(38) (2000), 4330-4332
- Reitz K., Transdermale therapeutische Systeme, *PTA in der Apotheke* 24(3) (1995), 110-112
- Richter M., Insulin nadellos und schmerzarm, *PZ* 145(18) (2000), 1420-1422
- Roberts M.S., Pugh W.J., Hadgraft J., Epidermal permeability: penetrant structure relationships. 2. The effect of H-bonding groups in penetrants on their diffusion through the stratum corneum, *Int. J. Pharm.* 132 (1996), 23-32
- Rodríguez-Hornedo N., Murphy D., Significance of controlling crystallization mechanisms and kinetics in pharmaceutical systems, *J. Pharm. Sci.* 88 (1999), 651-660
- Rodríguez-Hornedo N., Wu H.-J., Crystal growth kinetics of theophylline monohydrate, *Pharm. Res.* 8 (1991), 643-648
- Rote Liste 2002: <http://www.rote-liste.de>
- Saleki-Gerhardt A., Ahlneck C., Zografi G., Assessment of disorder in crystalline solids, *Int. J. Pharm.* 101 (1994), 237-247
- Santus G.C., Baker R.W., Review - Transdermal enhancer patent literature, *J. Contr. Rel.*, 25 (1993), 1-20
- Schalla W., Lokalapplikation und Therapeutische Systeme, in Kuemmerle, *Klinische Pharmakologie*, 22. Erg. (1989), 4. Aufl.
- Schiller M., Schmidt P.C., Arzneistoffe zum Aufkleben, *PZ* 147(22) (2002), 2344-2352

- Schmelzer J.W.P., Schmelzer Jr. J., Kinetics of nucleation at increasing supersaturation, J. Colloid Interface Sci. 215 (1999), 345-355
- Schmidt M., Transdermale therapeutische Systeme, PTA heute 8(9) (1994), 774-776
- Schmitt E.A., Law D., Zhang G.Z., Nucleation and crystallization kinetics of hydrated amorphous lactose above glass transition temperature, J. Pharm. Sci. 88(3) (1999), 291-296
- Schwarb F.P., Imanidis G., Smith E.W., Haigh J.M., Surber C., Effect of concentration and degree of saturation of topical fluocinonide formulations on in vitro membrane transport and in vivo availability on human skin, Pharm. Res. 16(6) (1999), 909-915
- Sebhatu T., Angberg M., Ahlneck C., Assessment of the degree of disorder in crystalline solids by isothermal microcalorimetry, Int. J. Pharm. 104 (1994), 135-144
- Selzer T., Einsatz der isothermen Wärmeleitungs-Mikrokalorimetrie zur Stabilitätsbeurteilung von festen Arzneiformen, Shaker-Verlag (1998)
- Selzer T., Radau M., Kreuter J., Use of isothermal heat conduction microcalorimetry to evaluate stability and excipient compatibility of a solid drug, Int. J. Pharm. 171 (1998), 227-241
- Selzer T., Radau M., Kreuter J., Use of isothermal heat conduction microcalorimetry to evaluate drug stability in tablets, Int. J. Pharm. 184 (1999), 199-206
- Shakhtshneider T.P., Vasilchenko M.A., Politov A.A., Boldyrev V.V., The mechanochemical preparation of solid disperse systems of ibuprofen-polyethylene glycol, Int. J. Pharm. 130 (1996), 25-32
- Singh P., Boniello S., Liu P., Dinh S., Transdermal iontophoretic delivery of methylphenidate HCl in vitro, Int. J. Pharm. 178 (1999), 121-128
- Smakula E., Gori A., Wotiz H.H., Effects of polymorphism and influence of sample preparation on the infra-red spectrum of estradiol-17 $\beta$ , Spectrochim. Acta 9 (1957), 346-356
- Spink C., Wadsö I., Calorimetry as an analytical tool in biochemistry and biology, Methods of Biochemical Analysis 23(1) (1976), 2-153
- Stefano F.J.E., Biali F.I., Scasso A.F., Crystallization in NETA - 17 $\beta$ -E2 transdermal patches, Proc. Int. Symp. Controll. Rel. Bioact. Mater. 24 (1997), 703-704

- Steiner T., 17 $\alpha$ -Ethyne-19-nor-3-oxo-4-androsten-17 $\beta$ -yl Acetate (Norethindrone Acetate), *Acta Cryst. C* 52 (1996), 2261-2263
- Suurkuusk J., Wadsö I., A multichannel microcalorimetry system, *Chem. Scripta* 20 (1982), 155-163
- Tantishaiyakul V., Kaewnopparat N., Ingkatawornwong S., Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinylpyrrolidone, *Int. J. Pharm.* 181 (1999), 143-151
- Taylor L.S., Langkilde F.W., Zografi G., Fourier transform raman spectroscopic study of the interaction of water vapor with amorphous polymers, *J. Pharm. Sci.* 90(7) (2001), 888-901
- Thermometric AB, Experimental & Technical Note EN 10, Mai 2000
- Thermometric AB, TAM Thermal Activity Monitor for highly sensitive isothermal analyses
- Tsai J.-C., Guy R.H., Thornfeldt C.R., Gao W., Feingold K.R., Elias P.M., Metabolic approaches to enhance transdermal drug delivery. 1. Effect of lipid synthesis inhibitors, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996), 643-448
- Variankaval N.E., Jacob K.I., Dinh S.M., Characterization of crystal forms of  $\beta$ -estradiol - thermal analysis, Raman microscopy, X-ray analysis and solid-state NMR, *J. Cryst. Growth* 217 (2000), 320-331
- Variankaval N.E., Jacob K.I., Dinh S.M., Crystallization of  $\beta$ -estradiol in an acrylic transdermal drug delivery system, *J. Biomed. Mat. Res.* 44 (1999), 397-406
- Vázquez J., López-Aleman P.L., Villares P., Jiménez-Garay R., Generalization of the Avrami equation for the analysis of non-isothermal transformation kinetics. Application to the crystallization of the  $\text{Cu}_{0.20}\text{As}_{0.30}\text{Se}_{0.50}$  alloy, *J. Phys. Chem. Solids* 61 (2000), 493-500
- Verhoeven J., Schaeffer R., Bouwstra J.A., Junginger H.E., The physico-chemical characterization of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylic acid: 2. Effect of water, PEG 400 and PEG 6000 on the glass transition temperature, *Polymer* 30 (1989), 1946-1950
- Weinberg M.C., Birnie III D.P., Avrami exponents for transformations producing anisotropic particles, *J. Non-Cryst. Solids* 202 (1996), 290-296

- Willson R.J., Beezer A.E., Mitchell J.C., A kinetic study of the oxidation of L-ascorbic acid (vitamin C) in solution using an isothermal microcalorimeter, *Thermochim. Acta* 264 (1995a), 27-40
- Willson R.J., Beezer A.E., Mitchell J.C., Loh W., Determination of thermodynamic and kinetic parameters from isothermal heat conduction microcalorimetry: Applications to long-term-reaction studies, *J. Phys. Chem.* 99 (1995b), 7108-7113
- Willson R.J., Beezer A.E., Mitchell J.C., Solid state reactions studied by isothermal microcalorimetry; the solid state oxidation of ascorbic acid, *Int. J. Pharm.* 132 (1996), 45-51
- Xijun C., Zhibin L, Rongzu H., Investigation of the crystallization kinetics of cyclotrimethylenetrinitramine and cyclotetramethylenetetranitramine by microcalorimetry, *Thermochim. Acta* 173 (1990), 193-198
- Ye F., Lu K., Crystallization kinetics of Al-Na-Ni amorphous alloy, *J. Non-Cryst. Solids* 262 (2000), 228-235
- Ziegenmeyer J., Transdermale Applikation von Arzneistoffen, *PZ* 134(18) (1989), 1085-1091

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Silvia Latsch, geb. Schulze
Geburtsdatum	23.06.1974
Geburtsort	Potsdam

## Schulausbildung

1981-1989	Polytechnische Oberschule in Potsdam
1989-1992	Gymnasium in Potsdam
1992-1994	Gymnasium in Frankfurt/Main
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Studium

1994-1999	Pharmaziestudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main
	Abschluss: 3. Staatsexamen und Approbation als Apothekerin

## Promotionsstudium

2000-2003	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Kreuter am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main
-----------	--

# **Veröffentlichungen und Kongressbeiträge**

## **Kongressbeiträge**

S. Schulze, T. Selzer, L. Fink, J. Kreuter, Use of isothermal heat conduction microcalorimetry to evaluate crystallization in TDDS, Proc. World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics Pharmaceutical Technology (2002) 361 – 362

## **Veröffentlichungen**

S. Latsch, T. Selzer, L. Fink, J. Kreuter, Crystallisation of estradiol containing TDDS determined by isothermal microcalorimetry, X-ray diffraction, and optical microscopy, Eur. J. Pharm. Biopharm. 56 (2003) 43 – 52

S. Latsch, T. Selzer, L. Fink, J. Kreuter, Determination of the physical state of norethindrone acetate containing TDDS by isothermal microcalorimetry, x-ray diffraction, and optical microscopy, Eur. J. Pharm. Biopharm. (in print)

S. Latsch, T. Selzer, L. Fink, M. Horstmann, J. Kreuter, Use of isothermal heat conduction microcalorimetry, X-ray diffraction, and optical microscopy for characterisation of crystals grown in steroid combination-containing TDDS, Eur. J. Pharm. Biopharm. (in print)

